

**Molekulare NIRF-Bildgebung von Makrophagen  
nach Markierung mit fluorochrombeladenen  
Liposomen: *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Verena Deißler**

geboren am 24. November 1979 in Heilbronn

Erster Gutachter: PD Dr. I. Hilger

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. D. Gottschild

Dritter Gutachter: Prof. Dr. A. Fahr

Tag der öffentlichen Verteidigung: 2. April 2007

## Abkürzungsverzeichnis

### Fachausdrücke und Einheiten

AIA	Antigen induzierte Arthritis
b. E.	Beliebige Einheiten
BF	Binningfaktor
bonSAI	Bio optical near infrared fluorescence Small Animal Imager
BSA	Bovines Serum Albumin
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CCD	Charge-coupled Device
Chol	Cholesterol
CLSM	Confocal Laser Scan Microscopy
CRP	C- reaktives Protein
CT	Computertomographie
DAPI	4',6- Diamidino-2-Phenylindol
D-MEM	Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPC	Ei-Phosphatidylcholin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FisH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung

FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
GFP	Green fluorescent protein
GM <sub>1</sub>	Gangliosid M <sub>1</sub>
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös
ICG	Indocyaningrün
KG	Körpergewicht
KM	Kontrastmittel
LPS	Lipopolysaccharid
MalPEG	Malimido-Phosphoethylenglykol
MRT	Magnetresonanztomographie
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NIR	Nahes Infrarot
NMRI	Naval Medical Research Institute
PBS	Phosphate buffered saline
PEG	Phosphoethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p. i.	Post injectionem
PPD	Purified Protein Derivative (gereinigtes Tuberkulin)
RES	Retikuloendotheliales System
Rho-PE	Rhodamin-Phosphatidylethanolamin
SPECT	Single-Photon-Emissions- Computertomographie

SSC	Side scatter (Seitwärtsstreulicht)
TNF $\alpha$	Tumor–Nekrose-Faktor Alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>I</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>3</b>
ZIELSETZUNG .....	13
<b>3 MATERIALIEN UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
3.1 VERWENDETE SUBSTANZEN UND GERÄTE.....	15
3.1.1 Der Nahinfrarotfarbstoff DY-676 (DYOMICS, Jena) .....	15
3.1.2 Das verwendete liposomale Kontrastmittel.....	16
3.1.3 Der bio optical near infrared fluorescence Small Animal Imager (bonSAI) (SIEMENS) .....	18
3.1.4 Die verwendete Untersuchungsplatte für die Vor- und Zellversuche.....	20
3.2 WEITERE SUBSTANZEN.....	21
3.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	22
3.4 WEITERE GERÄTE.....	23
3.5 VORVERSUCHE .....	25
3.5.1 Erstellen von Fluoreszenzintensitätskurven mit dem Farbstoff DY-676 in Abhängigkeit von der DY-676-Konzentration und der gerätetechnischen Parameter .....	25
3.5.2 Erstellen von Fluoreszenzintensitätskurven mit DY-676-markierter Liposomen in Abhängigkeit von der liposomalen DY-676-Konzentration und der Belichtungszeit.....	26
3.5.3 FACS-Analyse .....	26
3.5.4 Stabilitätsuntersuchung der Liposomen .....	27
3.6 ZELLKULTUR .....	28
3.6.1 Die verwendete Zelllinie J774A.1 .....	28
3.6.2 Kultivieren der Zelllinie J774A.1 .....	29
3.6.3 Passagieren von Zellen .....	29
3.6.4 Zellzahlbestimmung.....	30
3.7 IN VITRO-ZELLVERSUCHE.....	30
3.7.1 Inkubation von Makrophagen der Zelllinie J774A.1 mit unterschiedlichen Liposomenformulierungen.....	31
3.7.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie .....	32
3.7.3 Variation der Makrophagenkonzentration, der Inkubationszeit und der Liposomenkonzentration.. .....	33
3.8 IN VIVO-VERSUCHE .....	34
3.8.1 Die verwendeten Versuchstiere .....	34
3.8.2 Vorbereitung der Versuchstiere .....	34
3.8.3 Beschreibung der verwendeten Entzündungsmodelle .....	35

3.8.4	Beschreibung der Versuchsgruppen und Versuchdurchführung .....	35
3.8.5	Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung .....	38
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
4.1	VORVERSUCHE .....	39
4.1.1	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der DY-676-Farbstoffkonzentration .....	39
4.1.2	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität DY-676-markierter Grundliposomen vom Farbstoffgehalt und von der Belichtungszeit .....	45
4.1.3	Untersuchung der Stabilität DY-676-markierter Grundliposomen mittels FACS .....	46
4.2	IN VITRO-ZELLVERSUCHE .....	47
4.2.1	Fluoreszenzintensität von Makrophagen nach Inkubation mit unterschiedlichen Liposomenformulierungen .....	47
4.2.2	Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie .....	49
4.2.3	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von mit DY-676-beladenen Liposomen markierten Makrophagen von der Inkubationszeit .....	50
4.2.4	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Makrophagenkonzentration .....	52
4.2.5	Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Liposomen im Medium .....	54
4.3	IN VIVO-VERSUCHE .....	58
4.3.1	In vivo-NIR-Fluoreszenz-Bildgebung einer Peritonitis .....	58
4.3.2	In vivo-NIR-Fluoreszenz-Bildgebung eines Ohrödems .....	62
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>69</b>
5.1	VORVERSUCHE .....	69
5.2	IN VITRO-ZELLVERSUCHE .....	74
5.3	IN VIVO-VERSUCHE .....	77
	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>83</b>
	<b>ANHANG .....</b>	<b>93</b>
	DANKSAGUNG .....	93
	LEBENS LAUF .....	94
	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....	95

# 1 Zusammenfassung

Viele Erkrankungen der heutigen Gesellschaft, wie Typ-2-Diabetes, Atherosklerose oder das Kolonkarzinom werden inzwischen als eine Folge chronischer Entzündungen angesehen. Inflammatorische Prozesse spielen aber nicht nur eine Rolle in der Entstehung verschiedener Erkrankungen, sondern stellen nicht selten auch selbst eine lebensbedrohliche Gefahr dar, so z. B. die Peritonitis. Dies macht deutlich, dass die Früherkennung entzündlicher Prozesse ausschlaggebend für die Prognose von betroffenen Patienten ist. Dabei kommt bildgebenden Verfahren eine besonders wichtige Bedeutung zu. Klassische Bildgebungsverfahren wie konventionelles Röntgen, Sonographie, CT oder MRT bieten eine gute Darstellung der Anatomie und Pathomorphologie, jedoch gelingt es damit nicht, Erkrankungen schon aufgrund von ersten molekularen und zellulären Veränderungen zu diagnostizieren. Diese wichtige Aufgabe kann ein noch junges Feld auf dem Gebiet der bildgebenden Diagnostik, die so genannte molekulare Bildgebung bewältigen. Genutzt werden dabei zum einen szintigraphische Verfahren, die jedoch mit einer Belastung durch radioaktive Strahlung vergesellschaftet sind. Dagegen stellen optische Verfahren durch die Nutzung von Licht und Fluorochromen als Signalgeber eine gefahrlose Möglichkeit der nichtinvasiven Diagnostik dar. Besonders interessant ist dabei die Verwendung von Wellenlängen im nahen Infrarotbereich (NIR). Für diese Art der optischen molekularen Bildgebung wurden u. a. planare Bildgebungssysteme entwickelt. Als Kontrastmittel dienen Fluorochrome, die möglichst im NIR-Bereich absorbieren und emittieren, wie z. B. das Indocyaningrün oder dessen Derivate. Diese können als reine Substanz, an Antikörper gekoppelt oder in Liposomen eingebaut genutzt werden. Liposomen sind für die medizinische Forschung interessant, da sie nicht nur zum Einbau von Signalgebern für die Bildgebung, sondern auch für die Verkapselung von Medikamenten verwendet und so als bimodale Vesikel zur Therapieüberwachung herangezogen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst in Voruntersuchungen die optimalen Bedingungen für die Bildgebung mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (SIEMENS), dem NIR-Fluoreszenzfarbstoff DY-676 (Dyomics) und liposomal gebundenem DY-676 ermittelt. Dabei konnten unter anderem die „Detektionsgrenzen“ des Bildgebungssystems ermittelt werden. Auch die optimalen Einstellungen der gerätetechnischen Parameter wurden untersucht. In den anschließenden *in vitro*-Zellversuchen gelang es, murine Makrophagen mit DY-676-haltigen Liposomen zu markieren, wobei ein Einfluss der Art der Oberfläche der



Liposomen auf die Phagozytose beobachtet wurde. So stellte sich heraus, dass pegylierte Liposomen schlechter von den Zellen aufgenommen wurden als konventionelle Vesikel. Weiterhin konnte mittels optischer Bildgebung eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensitäten von der Zellzahl, der Inkubationszeit und der Liposomenkonzentration festgestellt werden. Die so mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI gewonnenen Ergebnisse wurden jeweils mit Hilfe etablierter zellbiologischer Methoden, wie z.B. der FACS-Analyse, bestätigt. Die erfolgreiche Markierung von Makrophagen mit Liposomen wurde durch Untersuchungen mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop verifiziert.

Der Hauptteil der Versuche bildete die *in vivo*-Anwendung des liposomalen Kontrastmittels und des optischen Bildgebungssystems bonSAI am Tiermodell. Zum einen diente eine Peritonitis als Entzündungsmodell, dabei stellte sich rasch heraus, dass sowohl das Kontrastmittel in Form der konventionellen Liposomen als auch in Form der pegylierten Liposomen zu einem hohen Fluoreszenzsignal im Bereich der Leber durch eine starke Anreicherung in diesem Organ führte und somit keine Differenzierung vom eigentlichen Entzündungsherd möglich war. Zum anderen diente ein Ohrödem als Entzündungsmodell. Dies führte zu einem deutlich erkennbaren Signal im Entzündungsbereich. Die Untersuchung der Organe wies jedoch auch in diesem Fall auf eine Akkumulation des Kontrastmittels in der Leber hin. Die Untersuchung der Kinetik des Entzündungsprozesses ergab einen Höhepunkt der gemessenen Fluoreszenzintensität 4 Stunden nach Induktion des Ödems und Gabe des Kontrastmittels.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass mit einem neuartigen Kontrastmittel auf Liposomenbasis und dem innovativen optischen Bildgebungssystem bonSAI eine frühzeitige Diagnostik von Entzündungsprozessen *in vivo* möglich ist. Der Nahinfrarotfarbstoff DY-676 stellt dabei einen effektiven Signalgeber dar. Das Problem der Leberakkumulation von Liposomen gilt es in weiteren Untersuchungen zu lösen. Generell liegt das Potential von Liposomen auf der Hand: Sie können nicht nur für die Bildgebung, sondern auch für die Therapie genutzt und so zukünftig als bimodales System zur Therapieüberwachung eingesetzt werden.

## 2 Einleitung

Die Entzündung ist eine „Reaktion des Organismus und seiner Gewebe gegen verschiedenartige (schädigende) Reize“ mit dem Ziel, „das schädigende Agens und seine Folgen zu beseitigen“ (PSCHYREMBEL 1998).

Das Verständnis dieser grundlegenden, schon bei kleinsten Verletzungen und vielerlei Krankheiten ablaufenden Reaktion, beschäftigte die Menschheit seit jeher. Die ersten uns bekannten Beschreibungen der Entzündung lieferten Celsus und Galen allein anhand von Beobachtungen. Celsus (30 v. bis 38 n. Chr. ) charakterisierte die Entzündung durch die Kardinalzeichen Rötung (rubor), Schwellung (tumor), Wärme (calor) und Schmerz (dolor), Galen (130 bis 200 n. Chr.) fügte diesen noch das Symptom der Funktionslosigkeit (functio laesa) hinzu (PUNCHARD et al. 2004). Bis heute dienen diese fünf Hauptzeichen als ein wesentliches Kriterium für die Diagnostik einer Entzündung. Im Laufe der Zeit wurde versucht, eine genauere Beschreibung der Entzündung zu formulieren. So definierte Sanderson 1871 die Entzündung als eine „Abfolge von Veränderungen, die in einem lebenden Gewebe zu beobachten sind, wenn es verletzt wird, und die dafür sorgt, dass die Verletzung nicht ein solches Ausmaß annimmt, wie wenn dessen Struktur und Vitalität plötzlich zerstört würde“ (SANDERSON 1871). Spector beschrieb 1963 die Entzündung als eine „Reaktion der lebenden Mikrozirkulation und der damit zusammenhängenden Gewebe auf eine Verletzung“ (SPECTOR, WILLOUGHBY 1963). Was den Sinn bzw. die Folgen des Entzündungsprozesses anbelangt, so stritten sich die Geister immer wieder. Während bereits in der Antike die Entzündung als ein Teil der Heilung angesehen wurde, herrschte bis Ende des 19. Jahrhunderts jedoch auch die Ansicht, die Entzündung sei eine nicht wünschenswerte Reaktion und schade dem Wirt. Jedoch erkannte man mit den Arbeiten von Metchnikoff und anderer erneut den Beitrag der Entzündung zum Abwehr- und Heilungsprozess. Weiter gilt sie heute als ein Eckpfeiler der Pathologie, in der die beobachteten Veränderungen ein Beispiel für Verletzung und Krankheit sind (PUNCHARD et al. 2004).

Heute erforscht man die Bedeutung der Entzündung bei den verschiedensten Erkrankungen. DER SPIEGEL bezeichnete 2004 die Entzündung als „Weltformel des Stoffwechsels“, die sich als zentraler Vorgang im Körper entpuppt (DER SPIEGEL 46/2004). So ist beispielsweise davon auszugehen, dass es sich beim Diabetes Typ 2 um eine Entzündungskrankheit handelt. Studien in den 1960er- Jahren und von 1997 und 1998 (PICKUP et al.) zeigten, dass der Typ-2-Diabetes mit einer subklinischen systemischen

Entzündung verbunden ist, wie erhöhte Spiegel an Glykoproteinen und Akutphasenproteinen (wie beispielsweise das C-reaktive Protein, CRP) sowie erhöhte Leukozytenzahlen zeigen (PICKUP et al. 1997; PICKUP, CROOK 1998). Später fand man heraus, dass erhöhte Spiegel an Akutphasenproteinen und Zytokinen prädiktiv für die Entwicklung eines Typ-2-Diabetes sind. Immunologische Untersuchungen belegten (1999/2001), dass Konzentrationen von CRP mit den Serumspiegeln von Interleukin-6 korrelieren und bereits bei Vorstufen des Diabetes erhöht sind, das gilt jedoch nicht für TNF $\alpha$  (MÜLLER et al. 2002). Herder et al. zeigten, dass die Erkrankung von einer „nicht-zufälligen und differenziell regulierten Aktivierung der natürlichen Immunität begleitet wird“ (HERDER et al. 2005).

Auch die Atherosklerose wird als lokaler, unspezifischer, inflammatorischer Prozess angesehen, der von einer systemischen Antwort begleitet wird. Prospektive Studien haben gezeigt, dass bereits leicht erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Marker, wie CRP, bei Gesunden, aber auch bei Patienten mit manifester Atherosklerose starke Prädiktoren für kardiovaskuläre Ereignisse darstellen. Weitere Ergebnisse legten nahe, dass CRP auch in der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle spielen könnte (KOENIG et al. 2003). Tschöpe verweist daneben auch auf die Bedeutung von Angiotensin II, das neben dem proinflammatorischen Stimulus Hypertonie auch selbst die Zytokinkaskade auslöst. Für die klinische Routinediagnostik am besten geeignet erachtet auch er das CRP (Ärzte Zeitung, 30.08. 2005). Zhao et al. berichteten einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des 5-Lipoxygenase-Pathways, der zur Biosynthese von proinflammatorischen Lipid-Mediatoren (Leukotrienen) führt, und dem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen, Myokardinfarkt und Schlaganfall (ZHAO et al. 2004).

Eine weitere Erkrankung, bei der entzündliche Prozesse eine Rolle in der Entstehung spielen, ist das Kolonkarzinom. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, tragen ein erhöhtes Risiko, an Darmkrebs zu erkranken. Dieses Risiko liegt für Patienten mit Colitis ulcerosa ca. 10-fach höher (KEWENTER et al. 1978, PRIOR et al. 1982, BROSTROM et al. 1987, EKBOM et al. 1990) und steigt mit der Dauer der Erkrankung weiter an (LASHNER et al. 1989). Für die Wahrscheinlichkeit, ein Kolonkarzinom zu entwickeln, spielt auch das Ausmaß der Kolitis eine Rolle, Patienten mit einer Pankolitis erkranken häufiger an Darmkrebs als solche, bei denen beispielsweise nur der linke Abschnitt des Darmes betroffen ist. (EKBOM et al. 1990; SUGITA et al. 1991). Welche Mechanismen dabei von Bedeutung sind, ist trotz intensiver Forschung noch nicht abschließend geklärt. Man vermutet, dass oxidativer Stress im Zusammenwirken mit erhöhtem Zellumsatz die genetischen Veränderungen hervorruft, die letzten Endes die

zellulären Transformationen in der entzündlich veränderten Darmschleimhaut bedingen. Auch eine Überernährung mit Eisen könnte zur Karzinogenese bei Colitis ulcerosa-Patienten beitragen, indem sie Entzündung und oxidativen Stress fördert. Auf der anderen Seite kann durch diätisch verabreichte Antioxidantien der oxidative Stress und somit das Risiko einer Karzinomentstehung bei Patienten mit Colitis ulcerosa verringert werden (SERIL et al. 2003).

Eine weitere, immer wieder auftretende und lebensgefährliche entzündliche Erkrankung ist die Peritonitis. Die Peritonitis ist eine „akute oder chronische Entzündung des Peritoneums“. Für eine Bauchfellentzündung kommen verschiedene Ursachen in Frage. In ca. 95% der Fälle ist sie infektiös bedingt, hier spielt vorwiegend eine Kontamination mit aerob-anaeroben Bakterien der Darmflora eine Rolle, die nach Perforation eines Hohlorgans, nach Durchwanderung der Darmwand oder lymphogen das Peritoneum infizieren. Auch eine intraoperative oder exogene Kontamination, z. B. durch Dialysat oder Messerstich-Verletzungen, kann zu einer Entzündung des Bauchfelles führen. Da diesen Fällen eine Erkrankung oder Schädigung von Organen im Bauchraum vorausgeht, spricht man von sekundärer Peritonitis. Selten dagegen ist die primäre Form durch hämatogene Streuung von z. B. Pneumo- oder Streptokokken oder die ascendierende Infektion mit Gonokokken über die Eileiter. Weiter kann die Bauchfellentzündung auch chemisch-toxische Ursachen haben, wenn sterile, entzündungsverursachende Substanzen lokal einwirken. Zu diesen Substanzen gehören Galle, Urin, Pankreassekrete, Chylus, der Inhalt von Zysten, Mekonium, Blutgerinnsel, aber auch bariumhaltige Röntgenkontrastmittel oder Fremdkörper, wie z. B. Nahtmaterial. Als dritte Form ist die strahlenbedingte Peritonitis zu nennen, die im Rahmen des Strahlensyndroms auftritt. Eingeteilt werden kann die Peritonitis nach der Lokalisation, nach pathologisch- anatomischen Gesichtspunkten oder nach dem jeweiligen Stadium der Erkrankung. Leitsymptom der akuten Bauchfellentzündung ist das Akute Abdomen mit heftigen bewegungsabhängigen Bauchschmerzen, begleitet von Übelkeit, Erbrechen, Obstipation und Meteorismus. Weiter prägen Exsikkose, Hypotonie, Tachykardie, Facies abdominalis und bei Vorliegen einer Infektion mit anaeroben und gramnegativen Bakterien auch Fieber und septischer Schock das Bild der Peritonitis. Neben der Erfassung der Symptome erfolgt eine körperliche Untersuchung, um die Diagnose Peritonitis zu stellen. Dabei äußert der Patient bei Palpation des Abdomens Schmerzen, man stellt eine Abwehrspannung fest und bei Auskultation fehlende oder klingende Darmgeräusche. Zur differentialdiagnostischen Abklärung sind labordiagnostische Untersuchungen einschließlich Blutkultur unumgänglich. Man erfasst hier Entzündungsparameter wie eine Erhöhung des CRP-Wertes oder der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG). Eine Entzündung

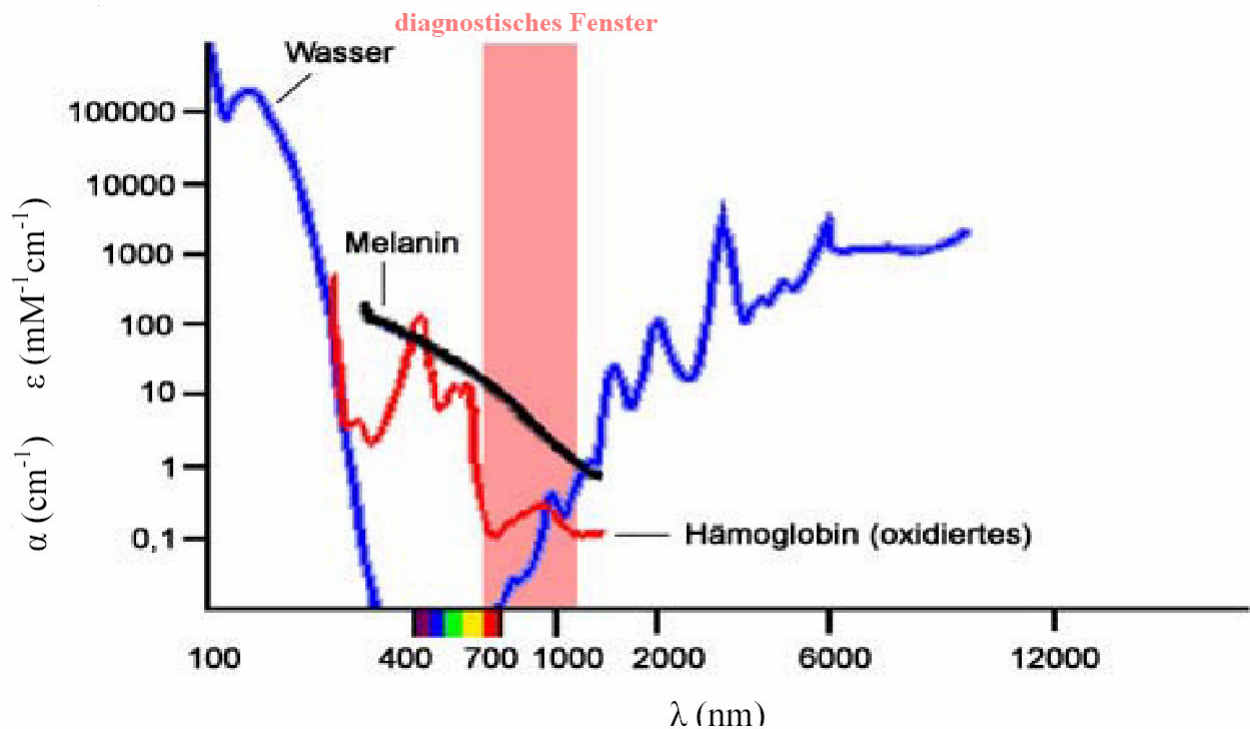
bedeutet auch stets eine Migration von Leukozyten, wie z.B. Makrophagen, durch permeabilitätsgestörte Blutgefäße in das entzündete Gewebe (PSCHYREMBEL 1998). Makrophagen sind zur Pino- und Phagozytose so genannter großer Partikel befähigte Zellen (PSCHYREMBEL 1998). Entzündungsmarker und Leukozytose stellen allerdings unspezifische Parameter dar, die keine eindeutige Diagnose oder eine Lokalisation des Entzündungsprozesses zulassen. Dafür ist der Einsatz von bildgebenden Verfahren notwendig. Routinemäßig eingesetzt werden hier das konventionelle Röntgen, die Sonographie oder Computertomographie (CT) (PSCHYREMBEL 1998). Diese können zwar die Ursache der Peritonitis aufdecken, liefern aber keine Information über die Bauchfellentzündung selbst. Es besteht auf diesem Gebiet demnach Forschungsbedarf.

Röntgen, Sonographie und CT gehören wie die Magnetresonanztomographie (MRT) zu den Methoden der „klassischen“ Bildgebung. Mit diesen Verfahren ist eine sehr gute Beurteilung der Anatomie und Pathomorphologie möglich. Das bedeutet aber auch, dass eine Krankheit erst dann diagnostiziert wird, wenn sie bereits morphologisch sichtbar ist. Jeder Erkrankung liegen aber molekulare Veränderungen zugrunde, die zum Teil lange vor der phänotypischen Ausprägung auftreten. Eine Krankheit bereits auf dieser Ebene festzustellen, wäre von immensem Vorteil für die Prognose des Patienten. Dies zu verwirklichen steht im Mittelpunkt einer noch jungen Disziplin in der Radiologie, der so genannten molekularen Bildgebung. Der Begriff der molekularen Bildgebung wird definiert als „*in vivo*-Charakterisierung und Messung biologischer Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene“. Die dadurch möglich werdende frühzeitige Diagnostik hat dementsprechend zur Folge, dass die nötigen Behandlungsmaßnahmen rechtzeitig eingeleitet werden können und veränderte Therapiestrategien möglich sind. Dadurch wird der Einsatz invasiver Eingriffe vermeidbar. Ebenso kann eine Therapieüberwachung, bereits kurz nach deren Beginn, stattfinden. Das Prinzip der molekularen Bildgebung besteht unter anderem in der Adaption etablierter Verfahren aus der biologischen Forschung, wie z. B. Antikörpertechniken, an die Methoden der Bildgebung. Für die molekulare Bildgebung sind verschiedene Elemente von Bedeutung. Zum einen wird ein für das zu detektierende Molekül spezifisches Kontrastmittel benötigt, das nicht nur biokompatibel sein, sondern den Zielort auch in nachweisbaren Konzentrationen über einen ausreichend langen Zeitraum erreichen muss. Des Weiteren sind ein Amplifikationsmechanismus und ein geeignetes Bildgebungsinstrument erforderlich. Auf letzterem Gebiet wurden zwar in den vergangenen Jahren Fortschritte erzielt, dennoch stehen weitere Verbesserungen von Bildgebungssystemen im Zentrum der aktuellen Forschung. Eine wichtige Rolle spielen hierbei hochauflösende MR- und nukleare Bildgebungsverfahren, wie

z. B. Mikro-MR oder MR-Spektroskopie und Mikro-Positronen-Emissions-Tomographie (Mikro-PET) oder Single-Photon-Emissions-Computertomographie (SPECT). Einsatzgebiete der molekularen Bildgebung sind die Tumordetektion mittels markierter Antikörper gegen einen spezifischen Rezeptor oder das Monitoring der Gentherapie mit Hilfe von Markergenen (WEISSLEDER, MAHMOOD 2001; HENGERER, MERTELMEIER 2001; HÖGEMANN et al. 2001,). So konnte beispielsweise in *in vivo*-Studien der in manchen Mammakarzinomen überexprimierte HER-2-Rezeptor mit Hilfe eines Cy5.5-markierten Antikörpers (HILGER et al. 2004) oder das in Kolonkarzinomen überexprimierte carcinoembryonale Antigen (CEA) mit Hilfe der PET (WAXMAN 2002) detektiert werden. Neben den genannten Beispielen kommt auch optischen Methoden eine wichtige Bedeutung für die molekulare Bildgebung zu.

Die optische Bildgebung, also die Diagnostik mit Licht, wurde erstmals 1929 von Cutler am Beispiel der Durchleuchtung der weiblichen Brust beschrieben (CUTLER 1929). Durch die starke Lichtstreuung im Gewebe und die dadurch limitierte Ortsauflösung wies das Verfahren eine eingeschränkte Spezifität und Sensitivität auf (CUTLER 1929). In den 1970er und 80er Jahren wurde durch die Weiterentwicklung von Videokameras, die Licht im sichtbaren oder Nahinfrarot- (NIR-) Bereich detektieren konnten, erneut das Interesse an der Transillumination, vor allem zur Diagnostik von Brustkrebs, geweckt, jedoch waren Sensitivität und Spezifität noch immer nicht zufrieden stellend (DREXLER et al. 1985, MONSEES et al. 1987, GESLIEN et al. 1985). Erst in den letzten Jahren erlebte die optische Bildgebung durch Fortschritte in der Photonengenerierung (z. B. mit der Weiterentwicklung der Laser- oder dem Einsatz der NIR-Technologie) und Verbesserung der Photonendetektion (sensitive CCD-Technologie) eine Renaissance (BREMER et al. 2001).

Besonders sinnvoll für die Anwendung *in vivo* ist dabei Licht im nahen Infrarotbereich (NIR). Im Gegensatz zum sichtbaren Licht, das nur wenige Millimeter ins Gewebe eindringen kann, beträgt die Eindringtiefe von Licht dieses Wellenlängenbereiches (650- 1000 nm) einige Zentimeter. Der Grund für dieses Phänomen liegt in der geringeren Absorption durch Hämoglobin und Wasser. Man spricht hier von einem „diagnostischen Fenster“ (Abbildung 1). (BREMER et al. 2001).



**Abbildung 1:**

“Diagnostisches Fenster”: Lichtabsorptionsspektren von oxidiertem Hämoglobin, Melanin und Wasser. Minimum im nahen Infrarotbereich (650 –1000 nm). Die Wellenlängenabhängigkeit des molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  (Hämoglobin und Melanin) bzw. des Absorptionskoeffizienten  $\alpha$  (Wasser) erfolgte mit doppellogarithmischer Achsenskalierung. (Quelle: Dissertation Axel Göhlert, Jena, 2002, modifiziert).

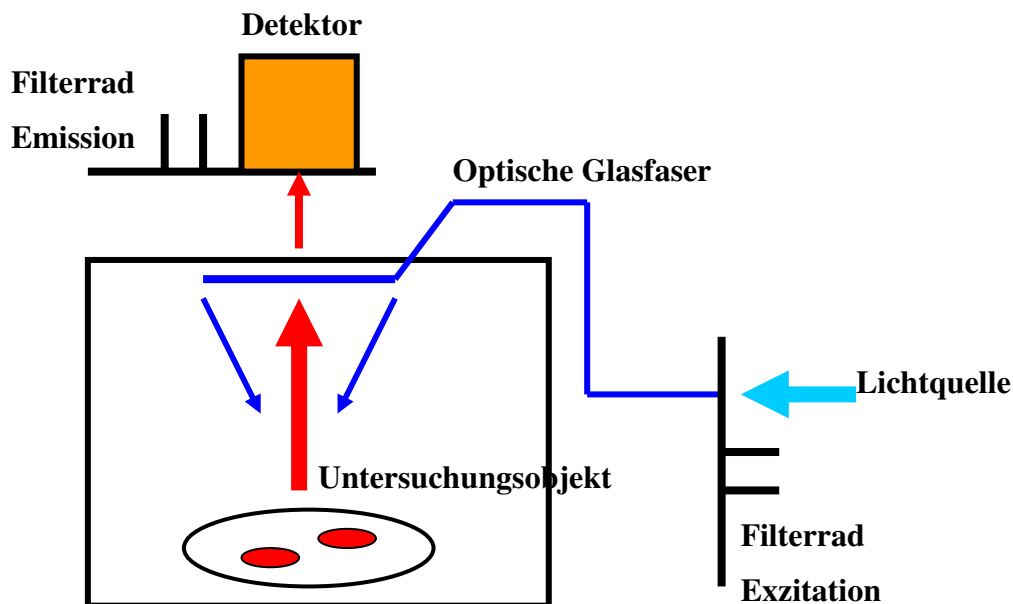
Dabei macht sich die Nahinfrarot-Bildgebung das Phänomen der Fluoreszenz zunutze. Fluoreszenz bedeutet, dass ein Molekül Licht absorbiert und längerwelliges Licht emittiert. Dabei absorbieren bestimmte Elektronen der fluoreszierenden Moleküle die Photonen und gelangen so auf ein höheres Energieniveau. Da sie sich auf diesem Niveau nur für eine begrenzte Zeit halten können, fallen sie fast im selben Augenblick wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurück und setzen dabei die aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenzlicht frei. Da jedoch während des angeregten Zustandes Energieverluste z. B. durch strahlungsarme Übergänge oder Kollisionen mit Lösungsmittel stattfinden und daher nicht die gesamte Energie des Anregungslichtes auch als Licht emittiert wird, ist das emittierte Licht energieärmer und damit auch längerwellig. Dieses Prinzip wird als Stokes-Regel bezeichnet, die Differenz der Wellenlängen der beiden Lichtarten (20 bis 50 nm) als Stokes-Differenz (LINKENHELD 2002).

Bei den heute verwendeten optischen Bildgebungssystemen unterscheidet man planare von tomographischen Systemen, die generell sensitiv, schnell und hochauflösend sein sollten (WEISSLEDER, MAHMOOD 2001). Zu den planaren Systemen gehören die Fluoreszenz-Reflexions- Bildgebung und die Transillumination. Bei den tomographischen Methoden kann

man eine Einteilung in Fluoreszenztomographie, Biolumineszenztomographie und photoakustische Tomographie vornehmen (NTZIACHRISTOS et al. 2005). Bei der Fluoreszenz-Tomographie werden multiple Punkte zu unterschiedlichen Zeiten an der Gewebegrenze beleuchtet und die gestreuten Lichtmuster um die Gewebegrenze herum mit einem Photodetektor oder einer CCD-Kamera detektiert. Jedes Lichtquellen-Detektor-Paar sorgt für eine andere Projektion durch das Gewebe, wenngleich es den sich verbreitenden Ausbreitungsmustern folgt. Für Fluoreszenzmessungen werden passende Filter dem Detektor vorgeschaltet. Einsatz findet dieses Verfahren in der molekularen Bildgebung von Tieren und Geweben. So können z. B. Entzündungsprozesse oder Tumoren dargestellt werden (NTZIACHRISTOS et al. 2005). Bei der Biolumineszenztomographie werden Enzyme eingesetzt, die ein Substrat in Anwesenheit von Sauerstoff oder anderen Faktoren in Licht umwandeln. Hierbei ist im Gegensatz zur Fluoreszenztomographie keine Beleuchtung von außen nötig, da die Lumineszenz durch biochemische Vorgänge im „Versuchsobjekt“ entsteht. *In vivo*-Anwendungen dieser Methode am Menschen werden kontrovers diskutiert und sind schwierig zu realisieren, da dieses Vorgehen zumeist den Einsatz genetisch veränderter Biomoleküle erfordert.

Die einfachste Weise, optische Reportermoleküle *in vivo* zu detektieren, sind planare Detektionssysteme. Bei der Transillumination oder Diaphanie wird das zu untersuchende Objekt mit einer Weißlicht- oder Laserlichtquelle „durchleuchtet“ und das das Gewebe durchdringende Licht wird mit einer Kamera detektiert. Bisherige Untersuchungen der Brust aber zeigten eine geringere Sensitivität und Spezifität der Methode gegenüber der konventionellen Mammographie (MONSEES et al. 1987, GESLIEN et al. 1985, GISVOLD et al. 1986). Die Fluoreszenz-Reflexions-Bildgebung ist vergleichbar mit der konventionellen Objektphotographie. Reflektierte bzw. emittierte Photonen von Oberflächenstrukturen werden mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert. Zur Darstellung spezifischer Fluoreszenzen werden die Fluorochrome über eine gefilterte Weißlicht- oder eine Laserlichtquelle mit der spezifischen Exzitationswellenlänge angeregt und die von den Fluorochromen emittierten Photonen über einen Emissionsfilter mit einer CCD-Kamera ausgelesen (BREMER et al. 2001; Abbildung 2).





**Abbildung 2:**

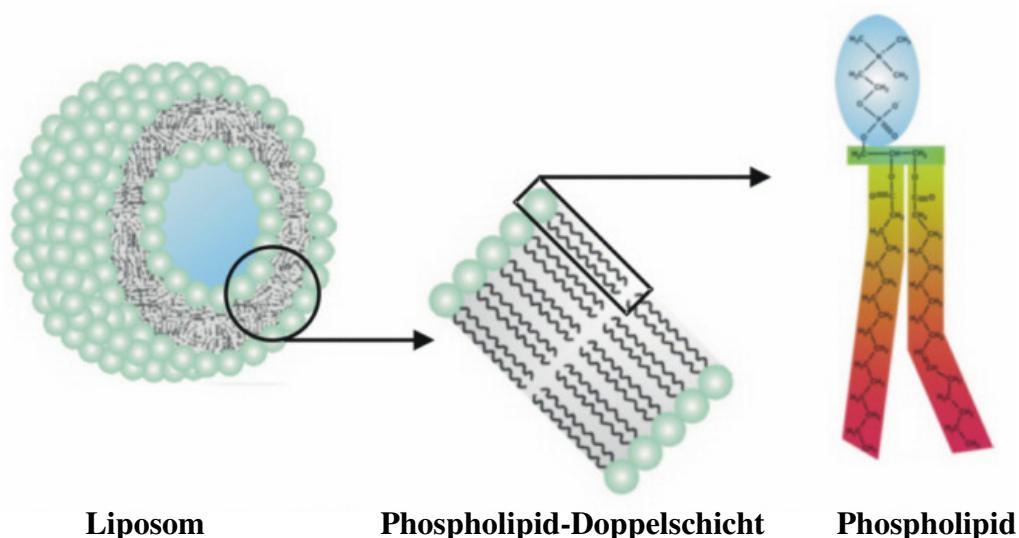
Schematische Darstellung eines planaren optischen Bildgebungssystems. Das Untersuchungsobjekt wird mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt (blau), das emittiert Licht (rot) wird von einer Kamera detektiert. Die Auswahl der gewünschten Anregungs- und Emissionswellenlängen erfolgt über entsprechende Filter.

Die Detektionsgrenze des Systems von Fluorochromen (wie Cy5.5) liegt bei Verwendung von gefiltertem Weißlicht im Pikomolbereich und ist daher zur Darstellung von bereits wenigen Rezeptoren hervorragend geeignet. Mit Laserlicht lässt sich die Sensitivität sogar noch um mehrere Zehnerpotenzen steigern. Die Bildgebung selbst dauert wenige Sekunden bis Minuten, die Bildverarbeitung kann unmittelbar an die Aufzeichnung erfolgen. Gewisse Probleme bereiten dabei Lichteigenschaften wie Streuung und Absorption, die die Detektionsgrenze auf einige Millimeter bis Zentimeter limitieren und so die quantitative Messung erschweren.

Neben den Geräten für die optische Bildgebung werden entsprechende Fluorochrome als so genannte Signalgeber benötigt. Diese sollten im NIR-Bereich absorbieren und emittieren und eine hohe Fluoreszenzquantenausbeute aufweisen, d.h. die Gesamtintensität des Fluoreszenzlichtes nach Absorption sollte möglichst hoch sein (LICHA et al. 2000). Daneben sollten sie nicht photosensibilisierend wirken, d. h. eine Lichtempfindlichkeit mit Auftreten von Hauterscheinungen nach Lichteinwirkung hervorrufen (aus PSCHYREMBEL). Weiter müssen sie photostabil sein, also durch Lichteinwirkung nichts von ihren Eigenschaften

einbüßen, und eine gute Wasserlöslichkeit aufweisen. In den letzten Jahren haben sich vor allem Cyaninfarbstoffe wie das klinisch zugelassene Indocyaningrün (ICG) als günstig erwiesen. Zunächst wurde ICG in der ophthalmologischen Fluoreszenzangiographie der Choroidea, für die Herz-Kreislauf-Physiologie und zu Funktionsuntersuchungen der Leber eingesetzt (FLOWER, HOCHHEIMER 1976, SCHAD et al. 1977, LEEVY et al. 1967). Erste Studien Ende der 1990er zeigten die Machbarkeit der Tumordetektion mit ICG, wobei der Kontrastierungsmechanismus hier auf einer unspezifischen Anreicherung des optischen Kontrastmittels in der zu detektierenden Läsion beruhte (RIEFKE et al. 1997, NTZIACHRISTOS et al. 2000, LICHA et al. 2000). Inzwischen wurden weitere Fluoreszenzfarbstoffe auf Basis des Indocyaningrüns entwickelt. Fluorochrome können für einen spezifischen Nachweis von zellulären Markern an Antikörper gekoppelt werden, daneben ist es aber auch möglich, diesen in Liposomen einzubauen, um ihn an seinen Bestimmungsort zu bringen.

Liposomen sind „kleine Hohlkugeln (Vesikel), deren Hülle aus einer oder mehreren Phosphatidylcholin-Lipid-Doppelschichten bestehen“ (Abbildung 3) (LAUTENSCHLÄGER 2003). Phosphatidylcholin wird dabei aus Lecithin isoliert, welches früher aus Hühnereigelb gewonnen wurde, heute jedoch fast ausschließlich aus Soja hergestellt wird. In Verbindung mit Wasser bilden sich die zellähnlichen Körper spontan aus (LAUTENSCHLÄGER 2003).



**Abbildung 3:**

Aufbau eines unilamellaren Liposoms. Das Phospholipid (i. d. R. Phosphatidylcholin) als Grundbaustein besteht aus einem hydrophilen Kopf- und einem hydrophoben Schwanzteil. In Anwesenheit von Wasser lagern sich die hydrophoben Anteile aneinander, so dass sich eine Doppelschicht ausbildet (Anonymus 2005).

Bereits so genannte „leere Hüllen“, also Liposomen ohne eingeschlossene Wirkstoffe, haben einen starken Effekt, der vor allem im Kosmetikbereich genutzt wird. Der Grund dafür liegt darin, dass das Phosphatidylcholin zwei für die Haut essentielle Stoffe enthält: Linolsäure für die Verstärkung der natürlichen Barrierefunktion der Haut sowie für die Zunahme der Hautfeuchte und Cholin für den Schutz der Haut und zur Prävention der Hautalterung. Darüber hinaus ist es möglich, Wirkstoffe (z. B. Vitamine) in Liposomen zu verkapseln und in die Haut zu penetrieren (LAUTENSCHLÄGER 2003). Ebenso können Fluorochrome für die optische Bildgebung in die Lipiddoppelschicht integriert werden, wodurch sich ein Einsatz für diagnostische Zwecke erschließt (siehe 3.1.2). So wurden beispielsweise bereits Untersuchungen durchgeführt, in denen farbstoffmarkierte Liposomen zur Darstellung von humanen Brustkrebszellen eingesetzt wurden (KIRPOTIN et al. 1997, PARK et al. 1995). Von den Liposomen ist weiterhin bekannt, dass sie zur Darstellung von Entzündungen eingesetzt werden können, allerdings wurden hier bisher vor allem Kontrastmittel auf  $^{99m}\text{Tc}$ -Basis verwendet, um damit entzündliche Darmerkrankungen (AWASTHI et al. 2002) oder die akute postoperative Mediastinitis nachzuweisen (ANDREOPOULOS et al. 2002). Der Nachweis dieser inflammatorischen Prozesse mittels Liposomen basiert dabei auf der Phagozytose der Vesikel durch Makrophagen, die, wie zu Beginn erwähnt, wesentliche Aufgaben während der Entzündung erfüllen. Dabei spielt die Oberfläche der Liposomen eine wichtige Rolle für die Aufnahme in die Zellen. Es ist bekannt, dass konventionelle Liposomen nach ihrer Applikation schnell von Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES), zu denen Makrophagen gehören, als Fremd erkannt und eliminiert werden und daher nur geringe Zirkulationshalbwertszeiten erreichen. Zu Beginn der 1990er erkannte man die zirkulationsverlängernde Wirkung des Gangliosids  $\text{GM}_1$  (ALLEN, CHONN 1987; LASIC et al. 1991) und von Polyethylenglykol (=PEG)-Kopfgruppen, die gegenüber  $\text{GM}_1$  biokompatibler sind (BLUME, CEVC 1990; ZEISIG et al. 1996). Die dadurch entstehenden langzirkulierenden Liposomen werden als Stealth-Liposomen bezeichnet.

Es wurde dargestellt, dass Liposomen mit verschiedenen Substanzen, wie z. B. mit Kontrastmittel, beladen werden können. Dadurch können sie auch auf dem Gebiet der optischen molekularen Bildgebung einen großen Beitrag zur Diagnostik leisten, insbesondere von Erkrankungen, die sich durch Änderungen zellulärer und molekularer Systeme auszeichnen.

## Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich Liposomen, die mit Fluorochrom beladen wurden, zur *in vivo*-Bildgebung entzündlicher Prozesse mit Hilfe eines planaren optischen Bildgebungssystems eignen.

Dazu sollen zunächst Vorversuche durchgeführt werden, in denen die optimalen Einstellungen wie Farbstoffkonzentration, Belichtungszeit, Binningfaktor oder automatische Korrektur eines Prototyps eines optischen Bildgebungssystems ermittelt werden müssen. Des Weiteren soll der Farbstoffgehalt in den Liposomen ermittelt werden, der am Besten für die Bildgebung mit dem planaren Bildgebungssystem geeignet ist. Außerdem muss die Stabilität der verwendeten fluorochrommarkierten Liposomen bezüglich der Fluoreszenz untersucht werden.

Den Vorversuchen schließt sich die *in vitro*-Phase an, in der murine Makrophagen fluorochrombeladenen Liposomen markiert werden sollen. Die Zellen für die *in vitro*-Versuche sollten murinen Ursprungs sein, weil in den anschließenden *in vivo*-Versuchen Mäuse als Tiermodell vorgesehen sind. Es werden verschiedene Teilversuche durchgeführt, in denen zunächst der Einfluss unterschiedlicher Oberflächen der Liposomen auf die Aufnahme in Makrophagen untersucht werden soll. Es gilt dabei herauszufinden, ob eine Pegylierung der Vesikel eine Veränderung der Aufnahme in Makrophagen, wie dies in der Literatur bereits häufig beschrieben wurde, bewirkt. Danach schließen sich Untersuchungen an, um optimale Voraussetzungen für die NIR-Bildgebung zu ermitteln. Dazu gehört, eine geeignete Zellzahl, Inkubationszeit und Liposomenkonzentration zu finden. Die Experimente am optischen Bildgebungssystem bonSAI sollen schließlich mit bereits etablierten zellbiologischen Methoden bestätigt werden.

Den Hauptteil der Arbeit bilden die *in vivo*-Versuche. In diesen sollen zwei verschiedene Modelle eines inflammatorischen Prozesses mittels optischer molekularer Bildgebung untersucht werden, zum einen die Peritonitis, zum anderen das Ohrödem. Als Auslöser für einen inflammatorischen Prozess kann in beiden Fällen Zymosan eingesetzt werden (AJUEBOR et al. 1998; de ALMEIDA et al. 2005; VOLMAN et al. 2004; KURNATOWSKA, PAWLIKOWSKI 2001, GOULET et al. 2000). Ein interessanter Aspekt der *in vivo*-Untersuchungen wird nicht zuletzt auch die bereits beschriebene Wechselwirkung der Liposomen mit Zellen des RES, also der Leber, sein. Eine Ansammlung des Kontrastmittels in der Leber kann möglicherweise zu einem Signal führen, das bei

Entzündungen in der Nähe dieses Organes (Peritonitis) die Diagnostik bis zur Unmöglichkeit erschweren kann.

Zusammenfassend dargestellt müssen also folgende Fragen geklärt werden, um die Darstellung von entzündlichen Prozessen *in vivo* mit Hilfe von fluorochrommarkierten Liposomen in einem planaren Nah-Infrarot-Kleintierscanner zu realisieren:

- Welches sind die optimalen Parameter zur Bildgebung mit dem Nah-Infrarot-Kleintierscanner?
- Welche ist die optimale Farbstoffkonzentration eines Nah-Infrarot-Farbstoffes in Liposomen zur Bildgebung mit dem Nah-Infrarot-Kleintierscanner?
- Sind die Liposomen stabil im Hinblick auf ihre Fluoreszenz?
- Spielt die Art der Oberfläche der Liposomen eine Rolle für die Aufnahme in Mausmakrophagen?
- Welches ist die optimale Inkubationszeit, Zell- und Liposomenkonzentration für den Nachweis von liposommarkierten Zellen im Nah-Infrarot-Kleintierscanner?
- Lassen sich die mit dem neuartigen optischen Bildgebungssystem gewonnenen Ergebnisse mit etablierten Methoden wie FACS-Analyse oder konfokaler Laser-Scan-Mikroskopie bestätigen?
- Lassen sich anhand von Entzündungsmodellen Makrophagen *in vivo* mit fluorochrombeladenen Liposomen markieren und anschließend im Nah-Infrarot-Kleintierscanner bildgebend darstellen?

### 3 Materialien und Methoden

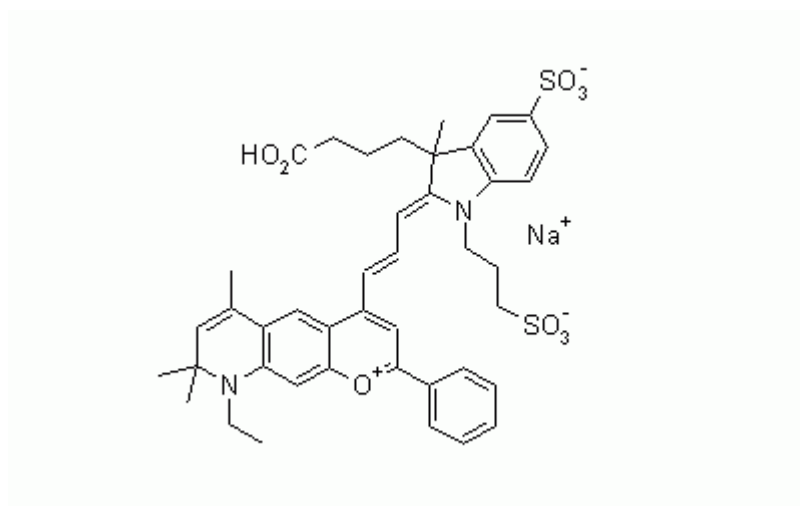
#### 3.1 Verwendete Substanzen und Geräte

##### 3.1.1 Der Nahinfrarotfarbstoff DY-676 (DYOMICS, Jena)

Der von der Firma DYOMICS zur Verfügung gestellte NIRF-Farbstoff DY-676 ist ein Hemicyanin-Farbstoff, der entweder als freie Säure (siehe Abbildung 4) oder in Form eines NHS-Esters zur Kopplung an Antikörper erhältlich ist. Dadurch kann er zum spezifischen Nachweis zellulärer Marker eingesetzt werden. Ebenso kann er für die FisH-Mikroskopie und die Gelelektrophorese verwendet werden (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Übersicht über die Charakteristika des Nah-Infrarot-Fluoreszenzfarbstoffes DY-676 (Dyomics, Jena)

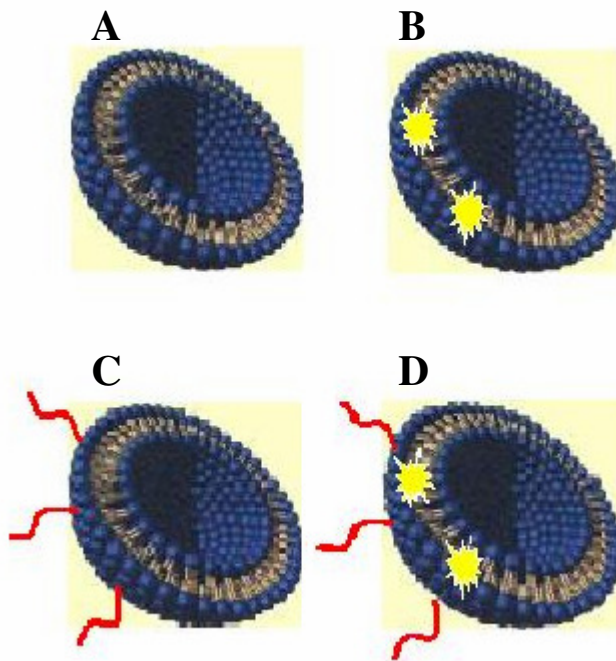
Absorptionsmaximum	674 nm
Emissionsmaximum	699 nm
Molekulargewicht	808,95 g/mol
Extinktionskoeffizient	180.000 M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
weitere Eigenschaften	<ul style="list-style-type: none"><li>- Löslich in Wasser; Methanol, DMF, DMSO</li><li>- Geeignet für Protein-Labeling, FisH-Mikroskopie, Gel-Elektrophorese</li></ul>

**Abbildung 4:**

Strukturformel des Nah-Infrarot-Farbstoffes DY-676 (freie Säure). (Quelle: Dyomics Catalogue, 4<sup>th</sup> Edition, Herbst 2005)

### 3.1.2 Das verwendete liposomale Kontrastmittel

Die Liposomen wurden in Kooperation mit dem Institut für Pharmazeutische Technologie der FSU Jena von Herrn Ronny Rüger hergestellt. Das Grundgerüst besteht aus Ei-Phosphatidylcholin (EPC) und Cholesterol (Chol). Diese werden im Folgenden als Grundliposomen bezeichnet (Abbildung 5A). Die Liposomen wurden in TRIS-Puffer (100mM; pH 7,6) aufbewahrt. Durch Modifikation der Oberfläche der Liposomen durch den Einbau des Ankers Malimido-Phosphoethylenglycol (MalPEG) bzw. durch den Einbau des Farbstoffes DY-676 standen unterschiedliche Formulierungen zur Verfügung. Die als Grund-DY bezeichneten Vesikel bestehen aus dem Grundgerüst mit in die Lipiddoppelschicht eingebautem DY-676. Liposomen mit der Bezeichnung MalPEG-Grund sind an der Oberfläche mit dem Lipidanker MalPEG versehen. Vesikel, die mit MalPEG-DY benannt sind, tragen sowohl an ihrer Oberfläche den Anker MalPEG, als auch eingebaut in die Lipiddoppelschicht den NIRF-Farbstoff DY-676 (Abbildung 5 und Tabelle 2).

**Abbildung 5:**

Schema des Aufbaus der in den Versuchen verwendeten Liposomen. Das Grundgerüst der Vesikel besteht aus einer Lipiddoppelschicht aus Ei-Phosphatidylcholin und Cholesterol. Diese werden als Grundliposomen bezeichnet [A]. [B] zeigt schematisch Liposomen, die mit dem Farbstoff DY-676 (Stern) beladen sind, Liposomen in Abb. [C] tragen an ihrer Oberfläche Malimido- Phosphoethylenglykol (MalPEG; rot dargestellt). Abb. [D] zeigt Liposomen, die sowohl mit DY-676, als auch mit MalPEG beladen sind. (Quelle: A: LAUTENSCHLÄGER 2003, B-C modifiziert).

**Tabelle 2:** Bezeichnung und Zusammensetzung der unterschiedlichen Liposomenformulierungen für die Herstellung des verwendeten optischen Kontrastmittels. EPC: Ei- Phosphatidylcholin; Chol: Cholesterol; MalPEG: Malimido-Phosphoethylenglycol

Bezeichnung der Liposomenformulierung	Grund	Grund-DY	MalPEG-Grund	MalPEG-DY
Zusammensetzung	EPC:Chol	EPC:Chol: DY-676	EPC:Chol: MalPEG	EPC:Chol: DY-676:MalPEG
Konzentration der einzelnen Komponenten (µmol/ml)	7:3	7:3:0,3	6:3:1	6:3:0,3:1



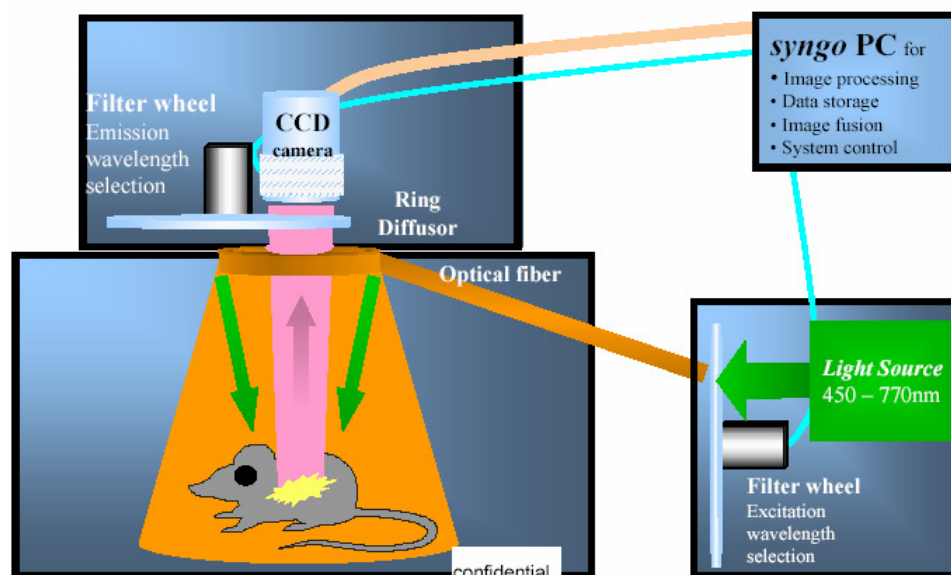
### 3.1.3 Der bio optical near infrared fluorescence Small Animal Imager (bonSAI) (SIEMENS)

Dieses für die *in vivo*-Kleintierbildgebung konzipierte planare optische Bildgebungssystem besteht zum einen aus einer Probenkammer, in der das Untersuchungsobjekt platziert wird, sowie einem Kopfteil, der die Lichtquelle, die verschiedenen Filter und die CCD- Kamera enthält, und zum anderen aus einem daran angeschlossenen Computer, der über die Software *syngo* die Bild- und Datenverarbeitung ermöglicht (Abbildung 6 und 7). So kann z. B. zwischen 2 Binningfaktoren gewählt werden. Binning bedeutet die Möglichkeit, Einzelpixel zu Pixelblöcken zusammenzufassen. Bei einem zweifach-Binning werden 2 Pixel vertikal und 2 Pixel horizontal zu einem Pixel zusammengefasst. Dadurch wird eine möglichst hohe Empfindlichkeit der Pixel erreicht (PAECH 2001). Gleichzeitig sinkt die Auflösung. Des Weiteren kann eine automatische Korrektur verwendet werden. Diese sorgt dafür, dass die gerätetechnisch bedingte inhomogene Ausleuchtung der Probenkammer rechnerisch ausgeglichen wird (Details siehe Tabelle 3).



**Abbildung 6:**

Der bio optical near infrared fluorescence Small Animal Imager (bonSAI) (Siemens). Dieses optische Bildgebungssystem besteht aus einer Kammer, in der das Untersuchungsobjekt platziert wird und dessen Kopfteil Lichtquelle, Filter und CCD-Kamera enthält (links), und einem PC, über den die Bedienung und Steuerung verschiedener Parameter sowie die Bild- und Datenverarbeitung möglich ist (rechts).

**Abbildung 7:**

Schematische Darstellung des optischen Bildgebungssystems bonSAI. Bei dem für die Kleintierbildgebung konzipierten Fluoreszenzimager wird die zu messende Probe mit Licht bestimmter Wellenlänge angeregt, das emittierte Licht von einer CCD-Kamera detektiert und die gewonnenen Daten an einen PC weitergeleitet. (Quelle: Introduction to bonSAI<sup>TM</sup>, Siemens medical solutions that help, Anke Siebert, PhD).

**Tabelle 3:** Übersicht über die technischen Daten des biooptischen Kleintierscanners bonSAI (SIEMENS)

Lichtquelle	150 mW Halogenlampe
Filter	447/527 nm (Abs./Em.) 527/610 nm 660/735 nm 662/800 nm Weißlicht
CCD- Kamera	Matrixgröße: 1360 (H) x 1024 (V) Pixel Dynamic Range: 12 bit Belichtungszeit: 0,1 – 120 s Binningfaktor: BF1 (1360 x 1024 Pixel; 4,6 x 4,6 µm per Pixel), BF2 (680 x 512 Pixel; 9,3 x 9,3 µm per Pixel)
Probenkammer	Homogen ausgeleuchtetes Feld: 12 cm <sup>2</sup>

Bei der Bildaufnahme entsteht ein so genanntes Falschfarbenbild in der Farbskala von blau bis rot. Farben im Blaubereich entsprechen niedrigen Fluoreszenzintensitäten, der Rotbereich steht für hohe Intensitäten. Entstehen Fluoreszenzbilder, die ein weißes Signal liefern, so befindet man sich im Bereich der Detektionsgrenze des Gerätes (Abbildung 8).



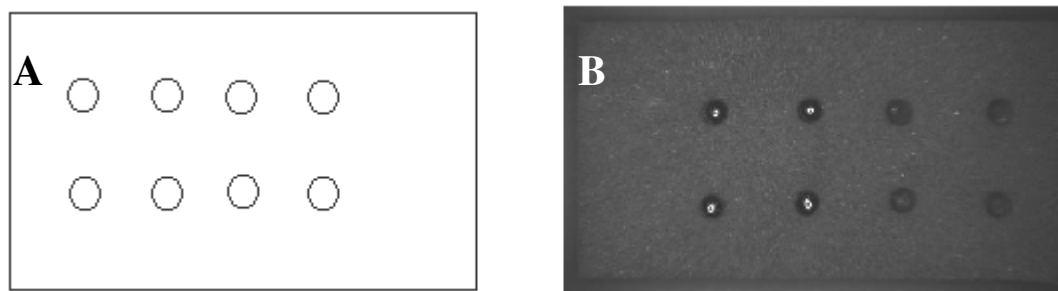
**Abbildung 8:**

Beispiel der farblichen Skaleneinteilung der Fluoreszenzintensitäten, wie sie für die bildgebende Darstellung der Fluoreszenzintensitätsmessungen des Kleintierscanners bonSAI verwendet werden.

Für die quantitative Auswertung des erhaltenen Bildes kann der gewünschte Bereich, die so genannte „region of interest“ (ROI) ausgewählt, und darüber der Mittelwert der Fluoreszenzintensität in diesem Bereich mit dazugehöriger Standardabweichung in beliebigen Einheiten (b. E.) ermittelt werden. Da die detektierte Fluoreszenz jedoch nicht nur vom verwendeten Fluorochrom, sondern auch vom Auftreten von Reflexionen und Streuung beeinflusst wird, ist eine absolute quantitative Auswertung nicht möglich. Aus diesem Grund handelt es sich in der vorliegenden Arbeit stets um semiquantitative Auswertungen.

### 3.1.4 Die verwendete Untersuchungsplatte für die Vor- und Zellversuche

Für die Vor- und *in vitro*-Zellversuche wurde eine eigens angefertigte 8-Well-Untersuchungsplatte verwendet. Diese bestand aus schwarzem Zellkautschuk mit darin eingelassenen und abgetrennten 50 µl-Reagiergefäßen (Abbildung 9). Das Probenvolumen jeder Vertiefung betrug 35 µl. Es war wichtig, dass die Platte eine möglichst matte Oberfläche aufwies, um gerätetechnisch bedingte Reflexionen zu vermeiden.

**Abbildung 9:**

Die selbstangefertigte 8-Well-Platte aus schwarzem Zellkautschuk mit Vertiefungen, in die abgetrennte 50 µl-Reagiergefäße eingelassen sind. In diese wurden für die Vor- und *in vitro*-Versuche die zu analysierenden Farbstoff- und liposomalen Lösungen bzw. die Zellsuspensionen transferiert und im optischen Kleintierscanner bonSAI untersucht. Maße der Platte: Länge: 13,4 cm; Breite: 5 cm; Höhe: 0,7 cm. [A]: Skizze, [B]: Lichtbildaufnahme.

### 3.2 Weitere Substanzen

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine Reihe unterschiedlicher Substanzen verwendet (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Übersicht über die in den Versuchen verwendeten Substanzen und deren Herkunft.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Bovine serum albumine (BSA)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
DAPI-Gebrauchslösung 5 µg/ml	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM, 25 mM Glucose; 1mM Natriumpyruvat)	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schottland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
F4/80-FITC, 100 µg/ml	BMA Biomedicals AG, Augst, Schweiz
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO BRL Life Technologies Ltd., Paisely, Schottland
Formaldehyd-Lösung 5% (v/v)	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hank's balanced salt solution (HBSS), 100	PAA Laboratories GmbH, Pasching,

mM	Österreich
Isofluran Curamed	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Liposomen	Ronny Rüger, Pharmazeut, Institut für Pharmazeutische Technologie der FSU Jena, Deutschland
Permafluor	Immunotech, Beckman Coulter Comp., Marseille, Frankreich
Phosphate buffered saline (PBS) 100 mM, pH 7,4 (NaCl 136,9 mM; KCl 2,7 mM; Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9,7 mM; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM)	Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tissue Tek O. C. T. Compound	Sakura Finetek B. V., Zoeterwoude, Niederlande
Trypanblau	Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland
Zymosan A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine Reihe unterschiedlicher Verbrauchsmaterialien verwendet (Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Übersicht über die in den Versuchen verwendeten Verbrauchsmaterialien und ihre Herkunft.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläser	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Bedford, MA USA
Glasmaterial	Merck Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

PP- Test tubes Cellstar® 15 ml	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäße 1,5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 50 µl	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark
Tissue Tek Vinyl Specimen Molds	Sakura Finetek Europe B. V., Zoeterwoude, Niederlande
Zellkulturflasche	Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 3.4 Weitere Geräte

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde eine Reihe unterschiedlicher Geräte verwendet (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Übersicht über die in den Versuchen verwendeten Geräte und ihre Herkunft.

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Akku-Boy Pipettus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Brenner Vulcan	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Brutschrank	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Konfokales Laser-Scan-Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
Eismaschine Ziegra	Dresdner Kühlanlagebau, Dresden, Deutschland

Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage isocal AC 211P	Satorius AG, Göttingen, Deutschland
Flow-Cytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Bedford, MA USA
Isofluranverdampfer Isotec 4	Ohmeda GmbH, Freiburg, Deutschland
Magnetrührer	IKA Labortechnik GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Olympus CK 40	Olympus, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Hanna Instruments, Portugal
Reinraumwerkbank	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Statistikprogramm SPSS11.0	SPSS Inc., Chicago, USA
Tabellenkalkulationsprogramm Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Thomakammer	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Vortex	Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y. USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Laborgerätektechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo	Hera Safe, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

### 3.5 Vorversuche

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen im Nahinfrarotbereich mit dem optischen Kleintierscanner bonSAI wurde über einen entsprechend ausgewählten Filter die Probe mit einer Wellenlänge von  $660 \pm 15$  nm ( $\lambda_{\text{Absorption}}$ ) angeregt und emittiertes Licht der Wellenlänge  $735 \pm 15$  nm ( $\lambda_{\text{Emission}}$ ) detektiert.

#### 3.5.1 Erstellen von Fluoreszenzintensitätskurven mit dem Farbstoff DY-676 in Abhängigkeit von der DY-676-Konzentration und der gerätetechnischen Parameter

Lösungen: **DY-676-Stammlösung** 0,5 mM in Aqua dest.

**PBS** 100 mM; pH 7,4

In diesem Versuch sollte die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes DY-676 in Abhängigkeit verschiedener Parameter, wie Konzentration des Farbstoffes, Belichtungszeit, Binningfaktor und Korrektur untersucht werden. Die Messungen erfolgten mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI.

Zunächst wurde aus der vorliegenden DY-676-Stammlösung eine Konzentrationsreihe hergestellt (Tabelle 7). Dazu wurde zunächst mit höher konzentrierten DY-676-Lösungen begonnen und eine schrittweise Verdünnung vorgenommen.

**Tabelle 7:** Herstellung einer Konzentrationsreihe des Farbstoffes DY-676 aus einer 0,5 mM Stammlösung zur Erstellung von Abhängigkeitskurven der Fluoreszenzintensität von der DY-676-Konzentration

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
DY-676-Konzentration in $\mu\text{M}$	50	4	0,8
	25	3	0,6
	10	2	0,4
	5	1	0
	0	0	

Von den einzelnen Lösungen wurden je 35  $\mu\text{l}$  in die unter 3.1.4 beschriebene 8-Well-Platte pipettiert. Als Kontrolle diente 100 mM PBS (pH 7,4). Mittels dem optischen Bildgebungssystem bonSAI wurde die Fluoreszenz der Lösungen in Abhängigkeit von der Belichtungszeit gemessen und ausgewertet.



### 3.5.2 Erstellen von Fluoreszenzintensitätskurven mit DY-676-markierter Liposomen in Abhängigkeit von der liposomalen DY-676-Konzentration und der Belichtungszeit

Lösungen:	<b>Liposomen Grund-DY</b>	DY-Gehalt 0,06; 0,3; 3 mol%;
		Phospholipidgehalt ca. 7,5 µmol/ml
	<b>Grundliposomen</b>	Phospholipidgehalt ca. 7,5 µmol/ml
	<b>TRIS-Puffer</b>	100mM; pH 7,6

Zur Erstellung von DY-676-konzentrationsabhängigen Fluoreszenzintensitätskurven wurden die drei unterschiedlichen liposomalen Lösungen (DY-676-Gehalt 0,06; 0,3 und 3 mol%, bezeichnet mit Ansatz 1, Ansatz 2 und Ansatz 3) mit TRIS-Puffer 1:100 verdünnt, um mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI bei entsprechenden Belichtungszeiten angemessene Fluoreszenzintensitäten zu erhalten und eine zu früh eintretende Sättigung zu vermeiden (Tabelle 8). Von diesen Verdünnungen wurden dann je 35 µl in die selbst angefertigte Zellkautschukplatte pipettiert und bei Binningfaktor 2 und unter Verwendung der Korrektur in Abhängigkeit von der Belichtungszeit die Fluoreszenzintensitäten gemessen.

**Tabelle 8:** DY-676- Konzentrationen in den Grund-DY-Liposomen (Lipo1 bis Lipo3) im Anlieferungszustand und in der 1:100-Verdünnung

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
DY-676-Konzentration in mol%	0,06	0,3	3
DY-676-Konzentration in µM	6	30	300
DY-676-Konzentration in der 1:100-Verdünnung in nM	0,06	0,3	3

### 3.5.3 FACS-Analyse

Zur Untersuchung physikalischer, wie z. B. fluorooptischer Eigenschaften von Zellen oder Partikeln wird häufig die Durchflusszytometrie, auch bekannt als FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) angewandt. Routinemäßigen Einsatz findet sie beim Nachweis von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mittels fluorochrommarkierter Sonden. Aber auch Partikel, wie die in dieser Arbeit verwendeten Liposomen oder von Zellen phagozytierte Kontrastmittel, können mit dieser Methode untersucht bzw. detektiert werden. Zur Analyse wird die Suspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenschnur an einem Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Dabei wird das

Fluorochrom zur Fluoreszenz angeregt. Die emittierte Photonenkonzentration ist proportional zur Menge an Farbstoff pro Partikel und lässt beim Einsatz von fluorochrommarkierten Antikörpern Rückschlüsse, z. B. auf die Expression von Oberflächenmolekülen, zu. Zusätzlich werden durch Lichtbeugung und -streuung Informationen wie Größe (Vorwärtsstreulicht, forward scatter, FSC) und Granularität (Seitwärtsstreulicht, side scatter, SSC) der Partikel gewonnen.

Das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences) verfügt über einen Argonlaser (15 mW; 488nm) und ermöglicht durch drei verschiedene Kanäle (FL1 bis FL3) die gleichzeitige Analyse von bis zu drei Fluorochromen (FL1: 530/30 nm- Bandpassfilter; FL2: 585/42 nm- Bandpassfilter; FL3: 670 nm- Langpassfilter). Der hier eingesetzte Farbstoff DY-676 wird im Kanal FL3 detektiert.

Die dazugehörige Software CellQuest ermöglicht u. a. die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten der analysierten Partikel in Form von Histogrammen, wobei in diesem Fall die mittlere Fluoreszenzintensität aller gemessenen Ereignisse ermittelt werden kann.

### 3.5.4 Stabilitätsuntersuchung der Liposomen

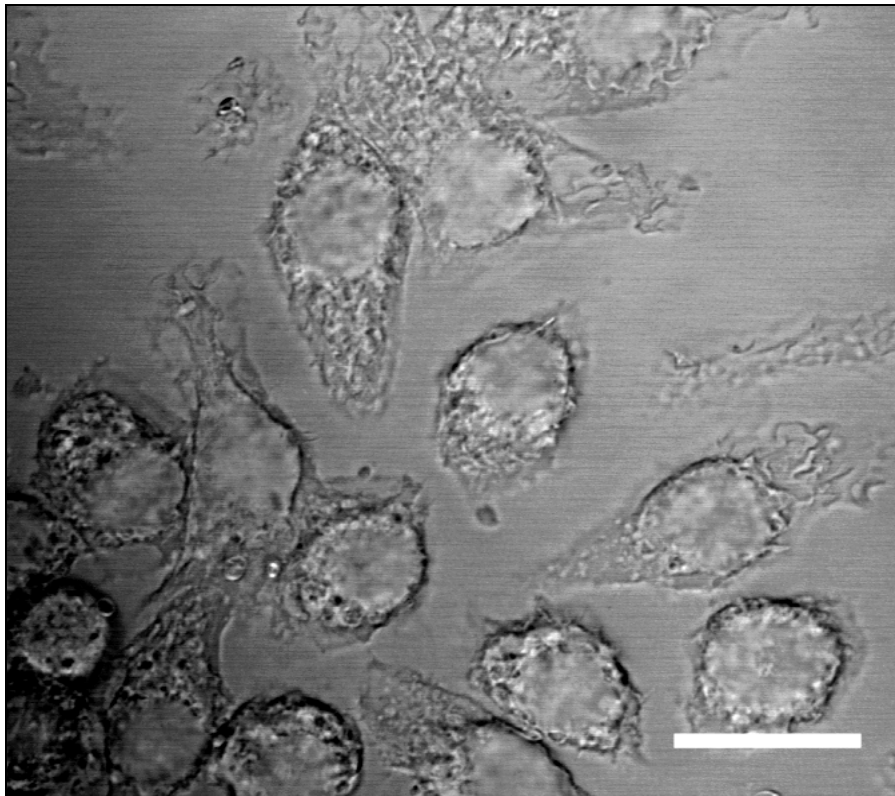
Lösungen:	<b>Liposomen Grund-DY</b>	DY-Gehalt 3 mol%;
		Phospholipidgehalt 10 µmol/ml
	<b>Liposomen Grund</b>	Phospholipidgehalt 10 µmol/ml
	<b>FACS- Puffer</b>	100 mM PBS, pH 7,4; 1% (w/v) BSA; 2 mM EDTA

In diesem Versuch sollte über einen Zeitraum von 2 Monaten untersucht werden, ob eine Lagerung der Liposomen bei 4°C und im Dunkeln einen Einfluss auf die optischen Eigenschaften hat, d. h. ob sich die Liposomen im Hinblick auf die Fluoreszenz stabil verhalten. Dazu wurden die Liposomen durchflusszytometrisch analysiert, um neben der Fluoreszenzintensität auch Informationen über die Größenverteilung zu erlangen. Die Liposomen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer versetzt. Die Probe mit den Liposomen ohne Farbstoff diente als Kontrolle. Um die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen miteinander vergleichen zu können, wurden für jede FACS-Analyse identische gerätespezifische Parameter verwendet.

### 3.6 Zellkultur

#### 3.6.1 Die verwendete Zelllinie J774A.1

Für die *in vitro*-Untersuchungen wurde die Makrophagenzelllinie *J774A.1* verwendet (Abbildung 10). Diese Zellen wurden aus einer Aszites bei vorliegendem Retikulumzellsarkom gewonnen. Sie wurden erstmals 1968 aus adulten weiblichen BALB/cN-Mäusen isoliert. Sie zeigen adhärentes Wachstum und besitzen die Fähigkeit zur antikörperabhängigen Phagozytose (RALPH, NAKOINZ 1975). Ihr Wachstum kann durch Dextransulfat, Purified Protein Derivative (PPD) und Lipopolysaccharide (LPS) gehemmt werden (RALPH, NAKOINZ 1977). *J774A.1*-Zellen synthetisieren Lysozym und Interleukin 1 beta. Für die *in vitro*-Versuche wurden Makrophagen der Passagen 11-35 verwendet.



**Abbildung 10:**

Morphologie der Makrophagen-Zelllinie *J774A.1* im Durchlichtmikroskop. Messbalken: 20 µm

### 3.6.2 Kultivieren der Zelllinie J774A.1

Lösungen: **Kulturmedium** DMEM mit 10% (v/v) FKS

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Reinraumwerkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> bzw. 160 cm<sup>2</sup> angezüchtet. Als Nährmedium wurde DMEM mit 10% FKS verwendet. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit (Standardkulturbedingungen).

Um eine optimale Versorgung der Zellen zu gewährleisten, musste alle zwei Tage das verbrauchte Kulturmedium durch frisches ersetzt werden. Dem Medium ist zur frühzeitigen Erkennung von pH-Veränderungen Phenolrot zugesetzt. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die gleiche Menge frisches Medium zugegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass das Medium nicht direkt auf den Zellrasen gegeben wurde, da sich so Zellen ablösen konnten. Anschließend wurden die Zellen zur Weiterkultivierung in den Brutschrank gestellt.

### 3.6.3 Passagieren von Zellen

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	DMEM mit 10% FKS
	<b>HBSS</b>	100 mM; pH 7,0 - 7,5

Bei einer mikroskopisch kontrollierten Konfluenz der Zellen von 80-90%, bezogen auf einen lückenlosen Zellrasen, wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und anschließend der Zellrasen dreimal mit raumtemperiertem HBSS gewaschen. Dabei war darauf zu achten, dass die Waschlösung auf die dem Zellrasen gegenüberliegende Seite gegeben wurde, um ein unnötiges Ablösen von Zellen zu vermeiden. Nach erneuter Zugabe von 10 ml frischem Nährmedium wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen in der Pipette gut resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einen 15 ml-Tube transferiert und es wurden 100  $\mu$ l für die Zellzählung abgenommen. Bis zur Aussaat der Zellen in neue Kulturgefäße wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde (siehe 3.6.4), wurde die gewünschte Anzahl an Zellkulturflaschen mit der entsprechenden Menge an Medium vorbereitet und  $4 \times 10^6$  Zellen in 30 ml Medium (Kulturflasche 160  $\text{cm}^2$ ) bzw.  $2 \times 10^6$  Zellen in 15 ml Medium (Kulturflasche 75  $\text{cm}^2$ ) ausgesät. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen im Brutschrank kultiviert und mussten alle 5-7 Tage passagiert werden.

### 3.6.4 Zellzahlbestimmung

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	DMEM mit 10% (v/v) FKS
	<b>HBSS</b>	100 mM; pH 7,0 – 7,5
	<b>Trypanblau-Stammlösung</b>	400 mg Trypanblau in 100 ml
		PBS (100 mM, pH 7,4; filtriert)

Für die Zellzählung wurden 100 µl der Zellsuspension mit 900 µl der Trypanblau-Stammlösung in einem 1,5 ml- Reagiergefäß gemischt. Davon wurden ca. 10 µl in zwei vorbereitete Thomakammern pipettiert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurden in beiden Kammern die Zellen innerhalb des Rasters und an jeweils zwei Rändern gezählt. Die Gesamtzellzahl im vorhandenen Suspensionsvolumen wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{\bar{x} * V_S * a}{V_T} = \frac{\bar{x} * 1000\mu l * 10}{0,064\mu l} = \text{Zellzahl}$$

$\bar{x}$	Quersumme der beiden ermittelten Zellzahlen
$V_S$	Volumen der Zellsuspension (1000µl) (900 µl Trypanblaulösung + 100 µl Zellsuspension)
a	Verdünnungsfaktor
$V_T$	Volumen der Thomakammer über dem Zählraster

### 3.7 *In vitro*-Zellversuche

Alle *in vitro*-Zellversuche mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI wurden mit  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15$  nm (siehe 3.5), mit Binningfaktor 2 und unter Verwendung der automatischen Korrektur durchgeführt. Die Aufnahme des Lichtbildes erfolgte bei 0,3 Sekunden Belichtungszeit.

### 3.7.1 Inkubation von Makrophagen der Zelllinie J774A.1 mit unterschiedlichen Liposomenformulierungen

Lösungen:	<b>Liposomenformulierungen</b>	s. Tabelle 1
	<b>Kulturmedium</b>	DMEM mit 10% (v/v) FKS
	<b>PBS</b>	100 mM; pH 7,4
	<b>FACS-Puffer</b>	100 mM PBS, pH 7,4; 1% (w/v) BSA; 2 mM EDTA
	<b>Trypanblau-Stammlösung</b>	400 mg Trypanblau in 100 ml PBS (100 mM, pH 7,4; filtriert)

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Art der Oberfläche der Liposomen auf die Aufnahme durch Makrophagen hat, wurden die Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm zu je  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät und 48h unter Standardbedingungen kultiviert. Zu einem Teil der Schalen wurden je 150 nmol einer der Liposomenformulierungen dazugegeben und für 2 Stunden inkubiert, die übrigen Schalen wurden als Kontrolle zur Untersuchung der Eigenfluoreszenz der Zellen bzw. zur Zellzahlbestimmung herangezogen. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, nicht aufgenommene Liposomen durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt, und die Zellen mittels Zellschaber vom Boden gelöst und durch mehrmaliges Aufziehen in die Pipette gut in PBS resuspendiert.

Zunächst wurden die Proben mit dem optischen Kleintierscanner bonSAI untersucht. Dazu wurde nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes das Zellpellet in 35  $\mu$ l PBS resuspendiert und das gesamte Volumen in die abgetrennten 50  $\mu$ l-Reagiergefäße der Zellkautschukplatte überführt. Die Belichtungszeit wurde zwischen 0,1 und 10 s variiert.

Für die anschließende FACS-Analyse wurden je 35  $\mu$ l Zellsuspension in FACS-Röhrchen transferiert und mit FACS-Puffer versetzt. Die FACS-Analyse erfolgte am Flow-Zytometer FACSCalibur.

### 3.7.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Lösungen:	<b>Kulturmedium</b>	DMEM mit 10% (v/v) FKS
	<b>PBS</b>	100 mM; pH 7,4
	<b>Liposomen Grund-DY</b>	s. Tabelle 4
	<b>Formaldehyd-Lösung</b>	3,7% (v/v) in 100 mM PBS (pH 7,4)
	<b>DAPI-Gebrauchslösung</b>	5 µg/ml
	<b>Goat-Anti-Mouse F4/80-FITC</b>	100µg/ml
	<b>Permafluor</b>	flüssig

Um zu zeigen, dass und in welchem Anteil der Makrophage sich der Farbstoff nach Phagozytose der Liposomen anreichert, wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop (CLSM, Confocal Laser Scan Microscopy) angefertigt. Dazu wurden die Zellen in Zellkulturschalen, in denen sich je ein Deckgläschen befand, ausgesät und 24 Stunden angezüchtet, um eine Haftung der Zellen an den Deckgläschen zu erzielen. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen mit DY-676-markierten Grundliposomen, entweder für 30 Minuten oder für 16 Stunden, um mögliche Unterschiede in der Aufnahme oder Anreicherung des Farbstoffes in den Zellen zeitabhängig aufzuzeigen. Nach Waschen wurden die Zellen mit einer 3,7%igen (v/v) Formaldehydlösung fixiert und die DAPI-Kernfärbung durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte eine Markierung des makrophagenspezifischen Antigens F4/80, ein Glykoprotein, das von Gewebsmakrophagen an der Zelloberfläche exprimiert wird, mit dem FITC-gekoppelten Antikörper Anti-Maus-F4/80. Dadurch werden Zellen als Mausmakrophagen identifiziert. Nach 30-minütiger Inkubation wurde ein weiteres Mal gewaschen und dann die mit den Zellen behafteten Deckgläschen auf einen mit Permafluor vorbereiteten Objektträger gegeben. Vor Anfertigung von mikroskopischen Aufnahmen wurden die Präparate mindestens 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop LSM510 (Zeiss), die Auswertung der gewonnenen Bilder mit der Software *LSM510 Image Examiner* (Zeiss).

### 3.7.3 Variation der Makrophagenkonzentration, der Inkubationszeit und der Liposomenkonzentration

Lösungen:	<b>Liposomen Grund-DY</b>	s. Tabelle 1; 3.1.2
	<b>Kulturmedium</b>	DMEM mit 10% FKS
	<b>PBS</b>	100 mM; pH 7,4
	<b>FACS-Puffer</b>	100 mM PBS, pH 7,4; 1% BSA; 2 mM EDTA
	<b>Trypanblau-Stammlösung</b>	400 mg Trypanblau in 100 ml PBS (100 mM, pH 7,4; filtriert)

Hierzu wurden die Zellen in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> zu je 2x10<sup>6</sup> Zellen ausgesät und 48h unter Standardbedingungen kultiviert.

Bei den Untersuchungen zur Variation der Zellkonzentration und der Inkubationszeit wurden die Zellen, außer der Kontrolle zur Analyse der Autofluoreszenz der Makrophagen, mit 150 nmol Lipid in Form der Grund-DY-Liposomen inkubiert, wobei die Inkubationszeit zwischen 2 und 72 Stunden variiert wurde. Nach Waschen, Ablösen der Zellen vom Flaschenboden und Zellzahlbestimmung wurden die Makrophagen jeder Inkubationszeit auf 0,1; 0,5; 1 und 5x10<sup>6</sup> Zellen pro 35 µl PBS eingestellt.

Bei dem Experiment zur Variation der Lipidkonzentration wurden die Makrophagen laut Tabelle 9 mit den Liposomen inkubiert, wobei eine Inkubationszeit von 16 Stunden gewählt wurde. Nach Waschen, Ablösen der Zellen vom Flaschenboden und Zellzahlbestimmung wurden die Makrophagen auf 5x10<sup>6</sup> Zellen pro 35 µl PBS eingestellt.

**Tabelle 9:** Variation der Menge an liposomalem Kontrastmittel (Grund-DY-Liposomen), mit dem die J774-Zellen inkubiert wurden. Zu je einer Zellkulturflasche wurde eine bestimmte Menge an Liposomen zugegeben und die Makrophagen für 16 h inkubiert. 0=Kontrolle: Makrophagen, die nicht mit Liposomen inkubiert wurden und damit die Eigenfluoreszenz der Zellen wiedergeben.

Lipidmenge in nmol	0	15	50	100	150	300
Resultierende Lipidkonzentration in µM	0	1	3,33	6,66	10	20
Resultierende DY-676-Konzentration in nM	0	31	100	210	310	610



Für die Untersuchungen mit dem optischen Kleintierscanner bonSAI wurde die Belichtungszeit zwischen 0,5 und 10 s variiert.

Im Anschluss daran wurden die Zellsuspensionen jedes Ansatzes in FACS-Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer versetzt und durchflusszytometrisch untersucht.

### **3.8 *In vivo*-Versuche**

#### **3.8.1 Die verwendeten Versuchstiere**

Für die *in vivo*- Versuche wurden NMRI-Mäuse verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Stamm von Albino-Mäusen, der aus einer Kreuzung nichtverwandter Individuen hervorgegangen ist. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere verwendet (n=22). Sie waren zum Zeitpunkt der Versuche zwischen 6 und 15 Wochen alt und zwischen 20 und 41g schwer.

#### **3.8.2 Vorbereitung der Versuchstiere**

Die Tiere erhielten über die Dauer der Versuche und mindestens fünf Tage vor deren Beginn eine spezielle pheophorbidarme Diät (Altromin, Lage, Deutschland) zur Vermeidung von Fluoreszenzsignalen im Verdauungstrakt und Wasser *ad libitum*.

In Vorbereitung und während der Versuche wurden die Mäuse per inhalationem mit Isofluran (2% v/v) narkotisiert. Wichtig für die Vermeidung von Lichtreflexionen durch das Fell war eine Rasur der Haut des darzustellenden Bereiches. So wurde bei den Tieren, denen eine Peritonitis induziert wurde, eine Rasur der Haut des Abdomens, bei den Tieren, denen ein Ohrödem induziert wurde, eine Rasur der Haut der Ohren und des Schädels vorgenommen.

Für die Untersuchungen im Bauchbereich mittels des optischen Bildgebungssystems bonSAI wurden die narkotisierten Mäuse rücklings und mit mittig ausgerichtetem Abdomen auf der Einschubplatte an den 4 ausgestreckten Extremitäten fixiert. Die Messungen im Bereich des Kopfes erforderten eine Fixierung der Tiere bäuchlings und mit mittig ausgerichtetem Schädel.

Alle *in vivo*-Untersuchungen mit dem biooptischen Kleintierscanner bonSAI erfolgten mit  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$  (siehe 3.5), mit Binningfaktor 1 und unter

Verwendung der automatischen Korrektur. Die Belichtungszeiten wurden zwischen 0,5 und 6 Sekunden variiert, die Lichtbilder wurden bei 0,3 Sekunden aufgenommen.

Alle Manipulationen an den Versuchstieren wurden nur durch dafür qualifizierte Personen vorgenommen. Alle Tierversuche waren vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz genehmigt (Reg.-Nr. 02-13/05).

### 3.8.3 Beschreibung der verwendeten Entzündungsmodelle

#### 3.8.3.1 Peritonitismodell

Lösungen: **Zymosan A- Suspension** 1% (v/v) in 100 mM PBS

Zunächst sollte eine Peritonitis als Modell für einen inflammatorischen Prozess dienen. Dazu wurde den ausgewählten Tieren 500µl einer 1%igen Zymosan A-Suspension intraperitoneal (i. p.) appliziert. Zymosan ist eine Präparation aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*, einem Hefepilz.

#### 3.8.3.2 Ohr-Ödem-Modell

Lösungen: **Zymosan A- Suspension** 1% (v/v) in 100 mM PBS

Als zweites Modell wurde eine Entzündung im Bereich des äußeren Ohres ausgewählt. Dabei wurde den ausgewählten Tieren 20µl einer 1%igen Zymosan A-Suspension in die Region des Ohransatzes injiziert (KURNATOWSKA, PAWLIKOWSKI 2001).

### 3.8.4 Beschreibung der Versuchsgruppen und Versuchsdurchführung

#### 3.8.4.1 Peritonitis

Lösungen:	<b>Zymosan A-Suspension</b>	1%
	<b>Liposomen Grund-DY</b>	s. Tabelle 1
	<b>Liposomen MalPEG-DY</b>	s. Tabelle 1
	<b>EDTA</b>	2 mM in 100 mM PBS
	<b>Formaldehydlösung</b>	5% (v/v)
	<b>DAPI-Gebrauchslösung</b>	5 µg/ml
	<b>F4/80-FITC</b>	100µg/ml
	<b>Permafluor</b>	flüssig

Es sollte eine Peritonitis mit Hilfe eines DY-676-haltigen liposomalen Kontrastmittels und des optischen Bildgebungssystems bonSAI bildgebend dargestellt werden. Die Tiere wurden in drei Gruppen aufgeteilt (A, B und C; siehe Tabelle 10). Bei den Mäusen in Gruppe A (n=2) sollte die Entzündung mit Hilfe des Kontrastmittels nachgewiesen werden, Tiere der Gruppe B (n=2) dienten als Kontrolle für die Eigenfluoreszenz des Gewebes bzw. des Entzündungsherd, Mäuse der Gruppe C (n=2) als Kontrolle für eine unspezifische Anreicherung des Kontrastmittels im Gewebe.

**Tabelle 10:** Einteilung der Tiere in drei Versuchsgruppen und Darstellung der jeweiligen Behandlung. +: es erfolgte eine Gabe der entsprechenden Substanz; -: die entsprechende Substanz wurde nicht appliziert. Jeweils n=2.

	Zymosan A	Kontrastmittel
Gruppe A	+	+
Gruppe B	+	-
Gruppe C	-	+

Zunächst wurde das Kontrastmittel in Form von DY-676-markierten Grundliposomen verabreicht. Da jedoch bekannt war, dass konventionelle Liposomen rasch von Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES), zu denen Makrophagen gehören, eliminiert werden und dieses Phänomen durch den Einsatz pegylierter Liposomen vermieden werden kann, wurde in einem zweiten Experiment ein Kontrastmittel in Form von pegylierten Liposomen getestet.

Die Tiere wurden wie unter 3.8.2 beschrieben vorbereitet. Zunächst wurde die Peritonitis mit 500 µl einer Zymosan A-Suspension, die intraperitoneal appliziert wurde, induziert. Im Anschluss daran wurde das Kontrastmittel injiziert, dabei wurden pro Kilogramm Körpergewicht der Maus 55 nmol liposomal gebundenen Farbstoffes über die Schwanzvene verabreicht.

Die Untersuchungen mit dem biooptischen Bildgebungssystem bonSAI erfolgte wie unter 3.8.2 beschrieben. Dabei wurden Aufnahmen vor, unmittelbar nach und 2h, 4h, 6h, 24h, 48h nach der Behandlung der Tiere angefertigt

Die Tiere wurden 6 bzw. 48 h nach Beginn des Versuches getötet, bei einigen Mäusen wurde eine Peritoneallavage mit einer 2mM EDTA-Lösung zur Gewinnung der Makrophagen und eine anschließende Eröffnung der Bauchhöhle durchgeführt. Der eröffnete Situs wurde im optischen Kleintierscanner bonSAI dargestellt. Anschließend wurden Milz, Leber, eine Niere und ein Teil des Darmes präpariert und ebenfalls im optischen Kleintierscanner bonSAI wie unter 3.8.2 beschrieben untersucht.

Die durch die Peritoneallavage gewonnenen Zellen wurden mit einer 5%igen Formaldehydlösung fixiert, gewaschen und auf Objektträger aufgebracht. Nach Antrocknen der Zellen wurden eine DAPI-Kernfärbung und eine Markierung mit dem FITC-gekoppelten Anti-Maus-F4/80 durchgeführt. Die mit Permafluor und Deckgläschen vorbereiteten Präparate wurden mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop untersucht.

### 3.8.4.2 Ohr-Ödem

Um eine räumliche Distanz von der Leber, in der mit einem starken Fluoreszenzsignal zu rechnen ist, zu schaffen, wurde eine Entzündung des äußeren Ohres als zweites Modell herangezogen. Die Tiere wurden hier in zwei Gruppen eingeteilt. Mäuse der einen Gruppe (Gruppe A; n=8) erhielten sowohl das Kontrastmittel in Form der DY-676- markierten Grundliposomen (55 nmol liposomaler DY-676 i. v.), als auch am linken Ohr ein Zymosandepot. Dabei konnte das kontralaterale Ohr als Kontrolle für eine unspezifische Anreicherung des Kontrastmittels dienen. Die Tiere der zweiten Gruppe (Gruppe B; n=8) erhielten nur ein Ohrödem und dienten ebenfalls als Kontrolle, ein Ohr diente dabei als Kontrolle für die Autofluoreszenz des Entzündungsgebietes, das andere für die Autofluoreszenz des Gewebes (siehe Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Einteilung der Tiere in zwei Gruppen, wobei das jeweilige Ohr als Untergruppe angesehen werden kann. +: es erfolgte eine Gabe der entsprechenden Substanz; - : die entsprechende Substanz wurde nicht appliziert. Jeweils n=8.

	Zymosan A	Kontrastmittel
Gruppe A	+	+
Gruppe B	+	-

Die Messungen mit dem optischen Kleintierscanner bonSAI erfolgten wie unter 3.8.2 beschrieben. Die Tiere wurden nach 4, 6 oder 48 Stunden getötet. Bei einigen Tieren wurden die Organe Milz, Leber und Niere im bonSAI bildgebend dargestellt, diese Aufnahmen erfolgten 6 h nach Behandlungsbeginn. Bei der Hälfte der Tiere wurde nach 4h eine Lavage der Ödemregion durchgeführt, um Makrophagen zu isolieren. Wie bereits beim Peritonitis-Modell beschrieben, wurden diese Zellen für die konfokale Laser-Scan-Mikroskopie gefärbt und vorbereitet.

### **3.8.5 Darstellung der Ergebnisse und statistische Auswertung**

Die Ergebnisse sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

Die Prüfung der vorliegenden Daten auf statistische Signifikanz erfolgte, soweit nicht anders angegeben mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben. Für die Berechnungen wurde das Programm SPSS11.0 eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurde  $p < 0,05$  als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

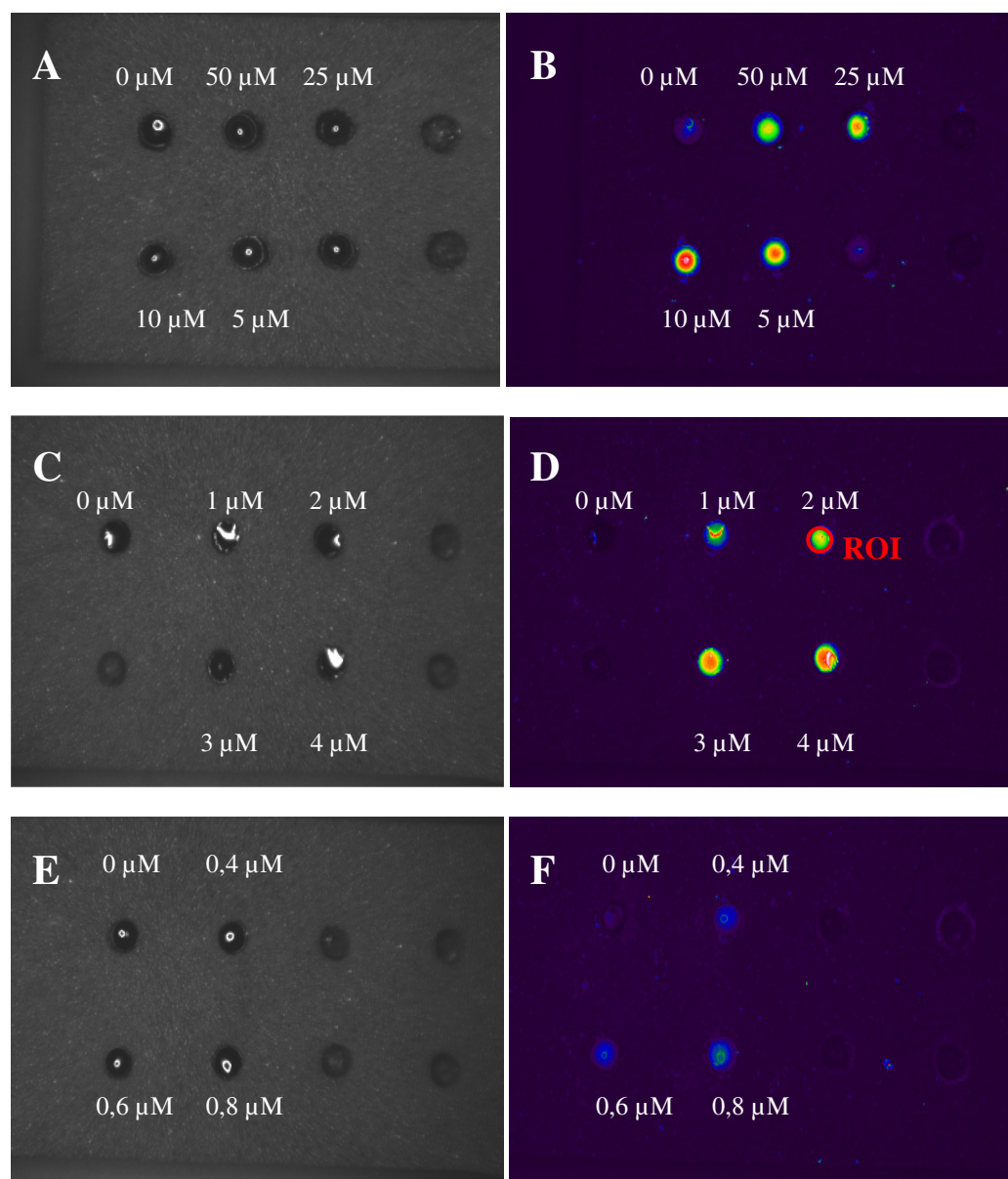
### 4.1 Vorversuche

#### 4.1.1 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der DY-676-Farbstoffkonzentration

Die Ermittlung der kritischen Farbstoffkonzentrationen und Belichtungszeiten mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 1 s; BF 2; ohne automatische Korrektur) zeigte bei der Analyse von DY-676-Konzentrationen zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  erhöhte Signalintensitäten gegenüber der 0  $\mu\text{M}$  DY-676-Lösung (=PBS). Es ist jedoch auch deutlich zu sehen, dass die Farbstofflösungen der Konzentrationen 50 und 25  $\mu\text{M}$  weniger fluoreszieren als die weniger konzentrierten Lösungen von 10 und 5  $\mu\text{M}$  (Abbildung 11B).

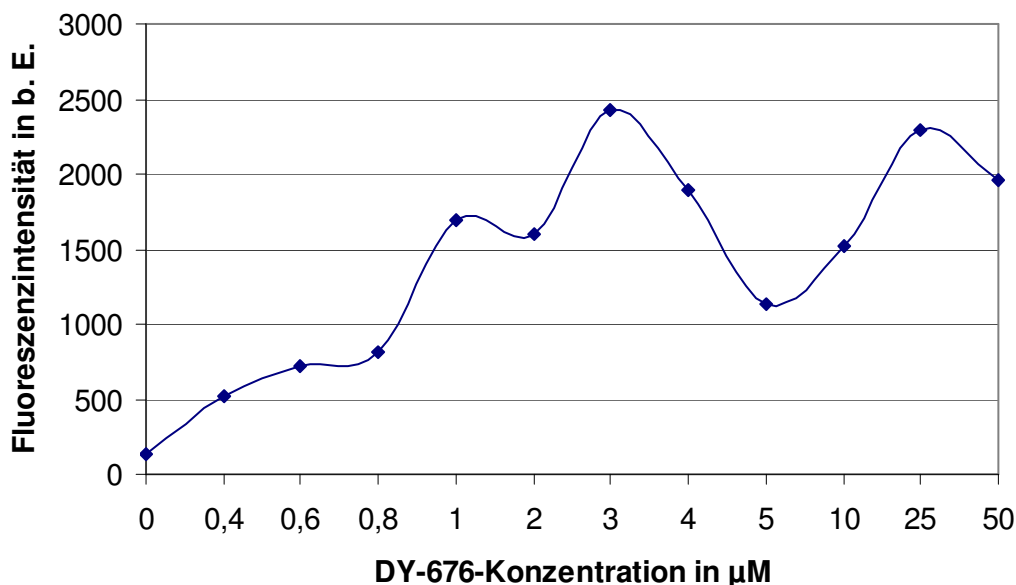
Lösungen mit Konzentrationen des DY-676 von 1  $\mu\text{M}$  bis 4  $\mu\text{M}$  lassen mit zunehmender Farbstoffkonzentration eine Zunahme des Fluoreszenzsignals erkennen (Abbildung 11D).

Farbstoffkonzentrationen von 0,4  $\mu\text{M}$  bis 0,8  $\mu\text{M}$  zeigen, dass auch hier mit zunehmender Farbstoffkonzentration ein Anstieg der Fluoreszenzintensität resultiert.

**Abbildung 11:**

Repräsentative Aufnahmen zur Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der DY-676-Konzentration mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. Linke Spalte: Weißlichtbilder (BZ 0,3 s; BF 2), rechte Spalte: NIR-Fluoreszenzbilder (BZ 1 s; BF 2;  $\lambda_{\text{Absorption}}$   $660 \pm 15$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}}$   $735 \pm 15$  nm). **[B]**: DY-676-Konzentrationen von 0 bis 50  $\mu\text{M}$ , **[D]**: DY-676-Konzentrationen von 0 bis 4  $\mu\text{M}$ , **[F]**: DY-676-Konzentrationen von 0 bis 0,8  $\mu\text{M}$ . In 11D ist beispielhaft die „region of interest“ (ROI) dargestellt, die zur semiquantitativen Auswertung der Fluoreszenzintensitäten verwendet wurde.

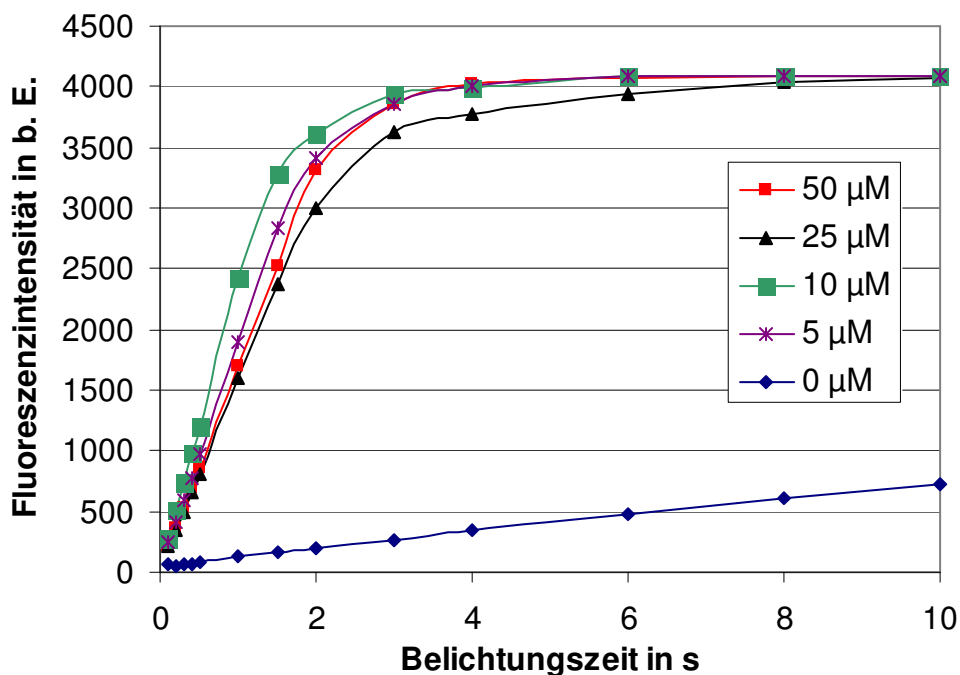
Für die semiquantitative Auswertung wurde für jede Farbstoffkonzentration die „region of interest“ (ROI) ausgewählt (siehe Abbildung 11D) und darüber eine Fluoreszenzintensität ermittelt. Diese wurde in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration graphisch dargestellt. Die Fluoreszenzintensität steigt bis zu einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  an, Konzentrationen über 3  $\mu\text{M}$  führen zu einem leichten Abfall der Fluoreszenzintensitäten (Abbildung 12).

**Abbildung 12:**

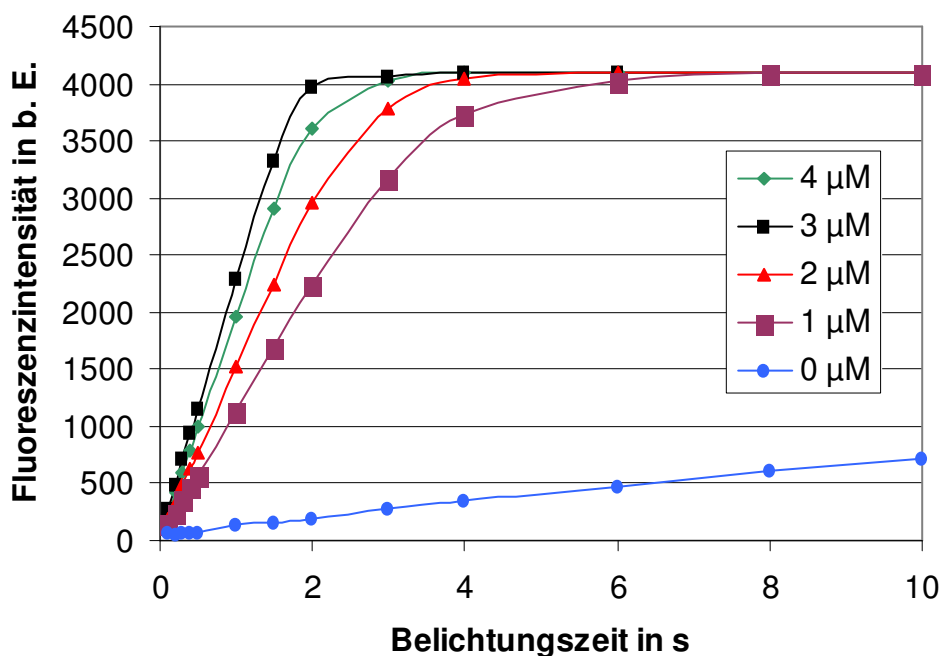
Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der DY-676-Konzentration (0 bis 50  $\mu\text{M}$ ) ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert) mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 1 s; BF 2,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind Ergebnisse, die durch einen zweiten Versuch bestätigt wurden.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Belichtungszeit zeigt im Bereich von 0,1 bis 1,5 s eine lineare Abhängigkeit. Bei höheren Belichtungszeiten nähern sich die Graphen einem Maximalwert von 4095 b. E., welcher der Detektionsgrenze des Gerätes entspricht (Abbildung 13). Diese Sättigung tritt in dem Versuchsansatz mit niedriger konzentriertem DY-676 (1 bis 4  $\mu\text{M}$ ) erst bei Belichtungszeiten von über 2 s (Abbildung 14), bzw. von über 3s (0,8  $\mu\text{M}$ ), 4s (0,6  $\mu\text{M}$ ) oder 6s (0,4  $\mu\text{M}$ ) ein (Abbildung 15). Man erkennt ebenso einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität bei der 0  $\mu\text{M}$  Lösung (=PBS).

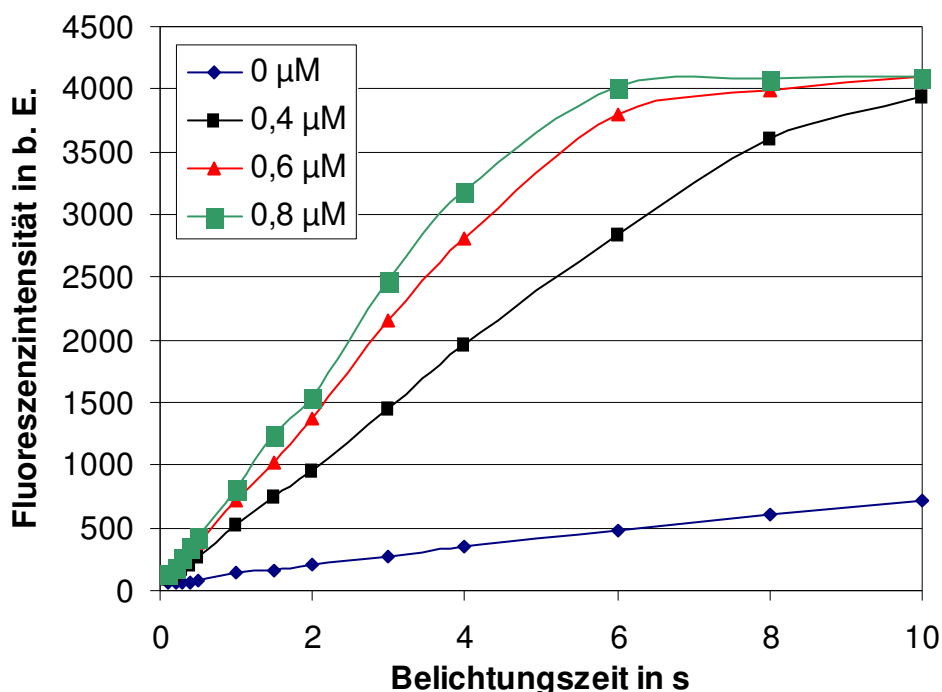


**Abbildung 13:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Belichtungszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Die Untersuchung wurde anhand unterschiedlich konzentrierter Fluoreszenzfarbstofflösungen (0 bis 50 µM) mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI durchgeführt (BF 1,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind Ergebnisse, die durch einen zweiten Versuch bestätigt wurden.

**Abbildung 14:**

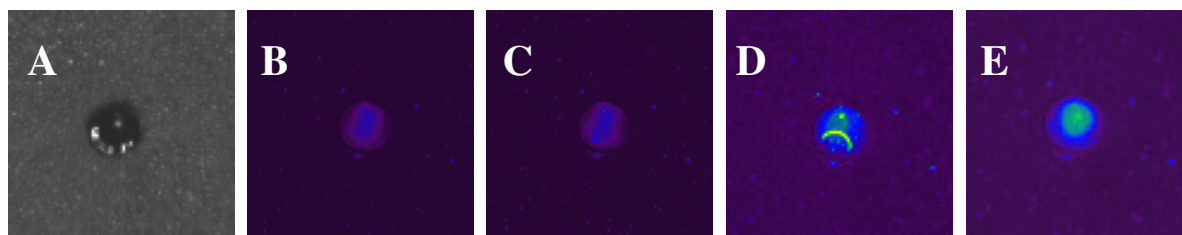
Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Belichtungszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Die Untersuchung wurde anhand unterschiedlich konzentrierter Fluoreszenzfarbstofflösungen (0 bis 4 µM) mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI durchgeführt (BF 1,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind Ergebnisse, die durch einen zweiten Versuch bestätigt wurden.



**Abbildung 15:**

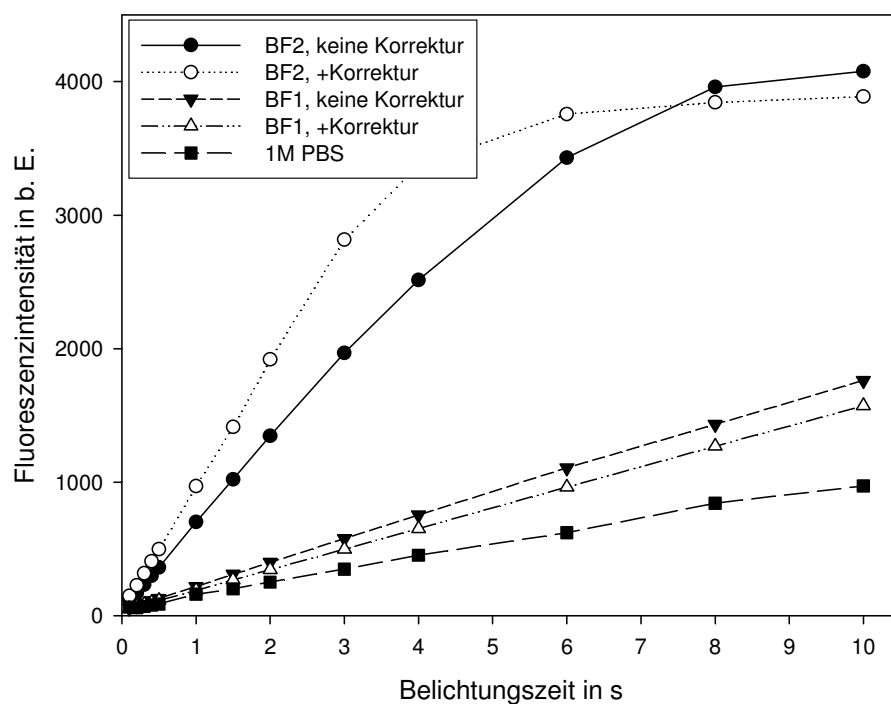
Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Belichtungszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Die Untersuchung wurde anhand unterschiedlich konzentrierter Fluoreszenzfarbstofflösungen (0 bis 0,8  $\mu\text{M}$ ) mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI durchgeführt (BF 1,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind Ergebnisse, die durch einen zweiten Versuch bestätigt wurden.

Die Ermittlung des Einflusses von Binningfaktor und automatischer Korrektur auf die Untersuchungen mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI zeigten, dass die Auswahl des Binningfaktors 1 (Abbildung 16B und C) zu geringeren Fluoreszenzintensitäten führt als die Verwendung des Binningfaktors 2 (Abbildung 16D und E). Die Verwendung der automatischen Korrektur verursachte bei Verwendung von Binningfaktor 1 keine deutlichen Unterschiede in der Fluoreszenzintensität (Abbildung 16B und C). Verwendet man Binningfaktor 2, so ist ein deutlicheres Fluoreszenzsignal bei Verwendung der automatischen Korrektur festzustellen als ohne die Korrektur (Abbildung 16D und E).

**Abbildung 16:**

Aufnahmen zur Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von den Parametern Binningfaktor und automatische Korrektur mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. [A]: Weißlichtbild (BZ 0,3 s; BF 2), **B bis E**: NIR-Fluoreszenzbilder (BZ 1 s;  $\lambda_{\text{Absorption}}$   $660 \pm 15$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}}$   $735 \pm 15$  nm). [B]: Binningfaktor 1, ohne Korrektur; [C]: Binningfaktor 1, mit Korrektur; [D]: Binningfaktor 2, ohne Korrektur; [E]: Binningfaktor 2, mit Korrektur.

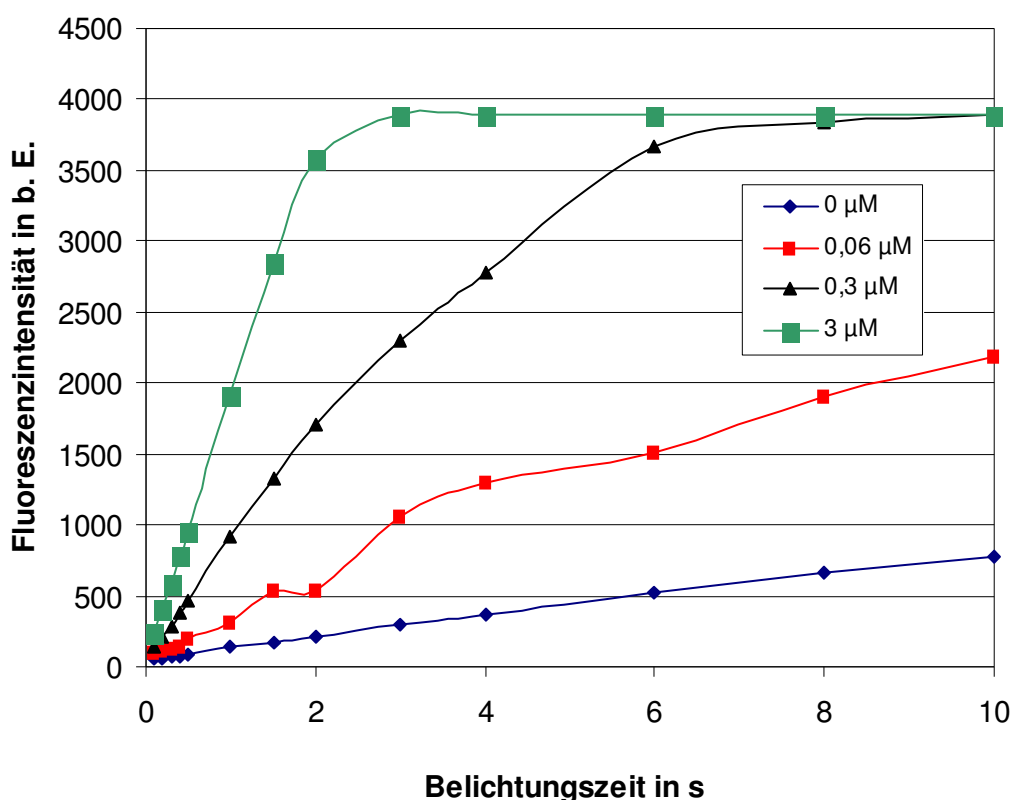
Die semiquantitative graphische Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von den einzelnen Parameterkombinationen und der Belichtungszeit zeigt außerdem noch einmal den bereits beobachteten Anstieg der Signalintensität mit ansteigender Belichtungszeit, wobei der Sättigungswert von 4095 b. E. lediglich unter Verwendung von Binningfaktor 2 erreicht wird (Abbildung 17).

**Abbildung 17:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Belichtungszeit und den Parametern Binningfaktor und Korrektur ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Die Untersuchung wurde mit einer Fluoreszenzfarbstofflösung einer Konzentration von  $0,6 \mu\text{M}$  mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI durchgeführt ( $\lambda_{\text{Absorption}}$   $660 \pm 15$  nm,  $\lambda_{\text{Emission}}$   $735 \pm 15$  nm). Es handelt sich um einen exemplarisch durchgeführten Versuch.

#### 4.1.2 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität DY-676-markierter Grundliposomen vom Farbstoffgehalt und von der Belichtungszeit

Die Untersuchungen zur Ermittlung des kritischen Farbstoffgehaltes in Liposomen mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI zeigte, dass die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration des Farbstoffes in den Liposomen von 0,06 mol% (0,06  $\mu$ M) bis 3 mol% (3  $\mu$ M) zunimmt (von 289,8 $\pm$ 11,9 auf 1886,3 $\pm$ 26,2 b. E., BZ = 1 s). Die Liposomen ohne Farbstoff weisen eine Eigenfluoreszenz auf (61,95 $\pm$ 0,8 bis 664,25 $\pm$ 80,9 b. E., BZ = 0,1 bis 10 s), die aber deutlich niedriger ist als die der fluorochrommarkierten Liposomen. So zeigen Liposomen mit 0,06mol% DY-676 Werte zwischen 84,5 $\pm$ 6,7 und 1972,35 $\pm$ 155,5 b. E., Liposomen mit 0,3mol% DY-676 Fluoreszenzintensitäten zwischen 124,55 $\pm$ 13,1 und 3880,4 $\pm$ 10,3 b. E. und Liposomen mit 3mol% DY-676 Werte zwischen 234,75 $\pm$ 5,4 und 3895,0 $\pm$ 0,0 b. E. (BZ jeweils 0,1 bis 10 s). Auch hier ist die bereits festgestellte Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Belichtungszeit bis zu einem Maximalwert (3895 $\pm$ 0,0) zu erkennen (Abbildung 18).



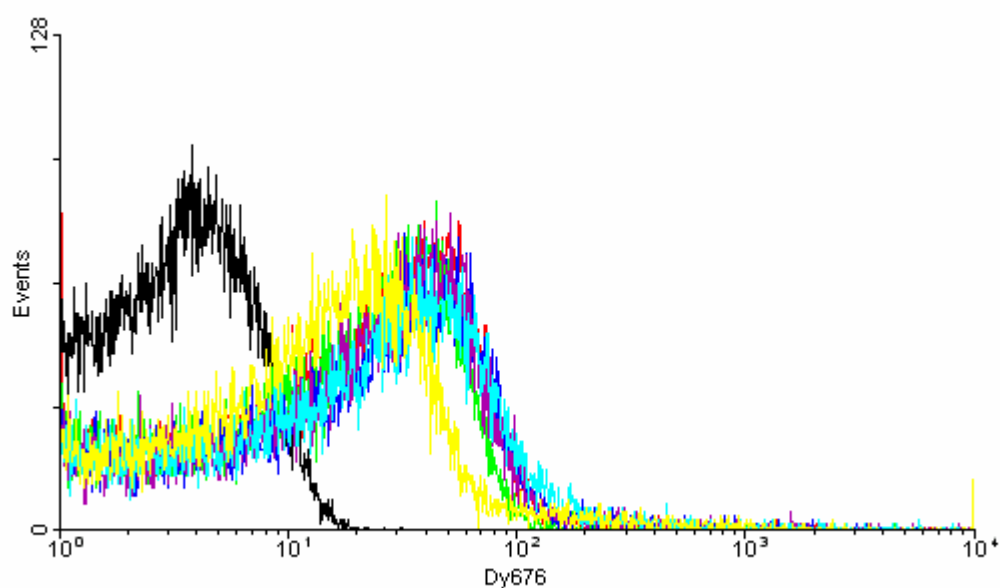
**Abbildung 18:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Belichtungszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Die Untersuchung wurden mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BF 2,  $\lambda_{\text{Absorption}}$  660  $\pm$  15 nm,  $\lambda_{\text{Emission}}$  735  $\pm$  15 nm) anhand von Liposomen mit unterschiedlichem DY-676-Gehalt (0 bis 3 mol%) durchgeführt. Dargestellt sind Ergebnisse, die durch einen zweiten Versuch bestätigt wurden.

### 4.1.3 Untersuchung der Stabilität DY-676-markierter Grundliposomen mittels FACS

Die Untersuchung der Stabilität DY-676-markierter Grundliposomen (3mol% DY-676) mittels FACS-Analyse über einen Zeitraum von 56 Tagen ergab bis 28 Tage nach Herstellung der Vesikel keine Änderungen der Fluoreszenzintensitäten der DY-676-markierten Liposomen (Abbildung 19, farbige Kurven außer gelb). Nach 56 Tagen wurde eine leicht schwächere Fluoreszenzintensität gemessen (Abbildung 19, gelbe Kurve). Liposomen ohne Farbstoff zeigen die Eigenfluoreszenz der Liposomen und dienten als Kontrolle (Abbildung 19, schwarze Kurve).

Da die Stabilitätsuntersuchungen nicht Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit waren und sich auch keine Beeinträchtigungen der Liposomen durch die Lagerung ergaben, wurde dieser Versuch exemplarisch durchgeführt.



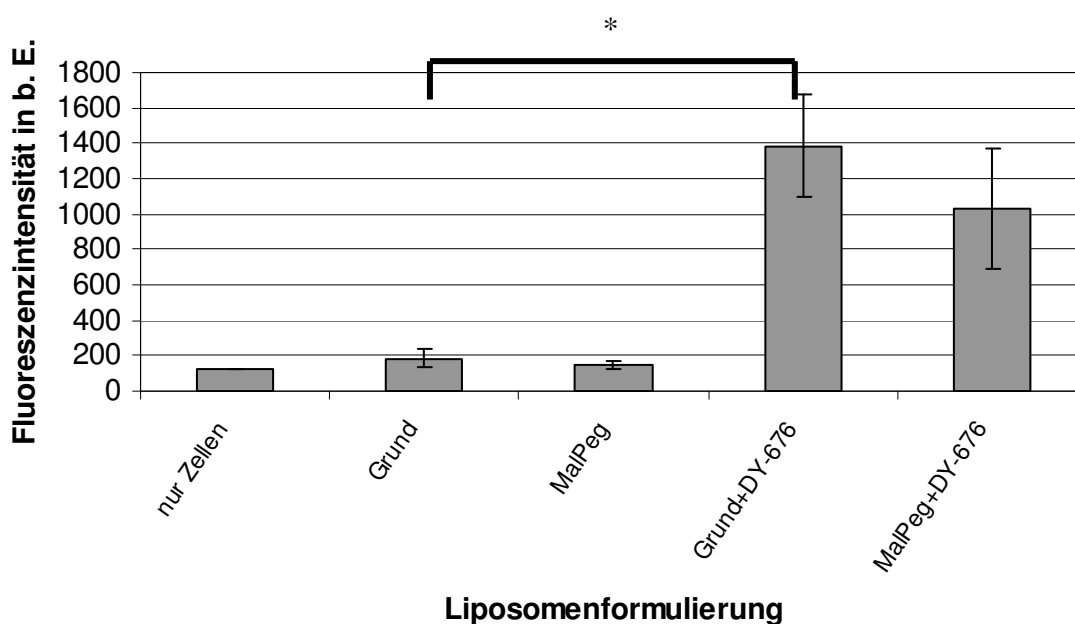
**Abbildung 19:**

Repräsentative Histogramm-Blots der FACS-Analyse von Liposomen mit und ohne DY-676 zur Untersuchung ihrer Stabilität. Die Liposomen wurden über einen Zeitraum von 56 Tagen wöchentlich und zuletzt nach 28 Tagen durchflusszytometrisch untersucht. [**Schwarz**]: Histogramm-Blot von Liposomen ohne DY-676 (Kontrolle); [**Rot**]: Liposomen mit DY-676 zum Zeitpunkt 0 („frische“ Liposomen); [**Grün**]: Liposomen 7 Tage nach Herstellung; [**Blau**]: Liposomen 14 Tage nach Herstellung; [**Violett**]: Liposomen 21 Tage nach Herstellung; [**Hellblau**]: Liposomen 28 Tage nach Herstellung; [**Gelb**]: Liposomen 56 Tage nach Herstellung.

## 4.2 *In vitro*-Zellversuche

### 4.2.1 Fluoreszenzintensität von Makrophagen nach Inkubation mit unterschiedlichen Liposomenformulierungen

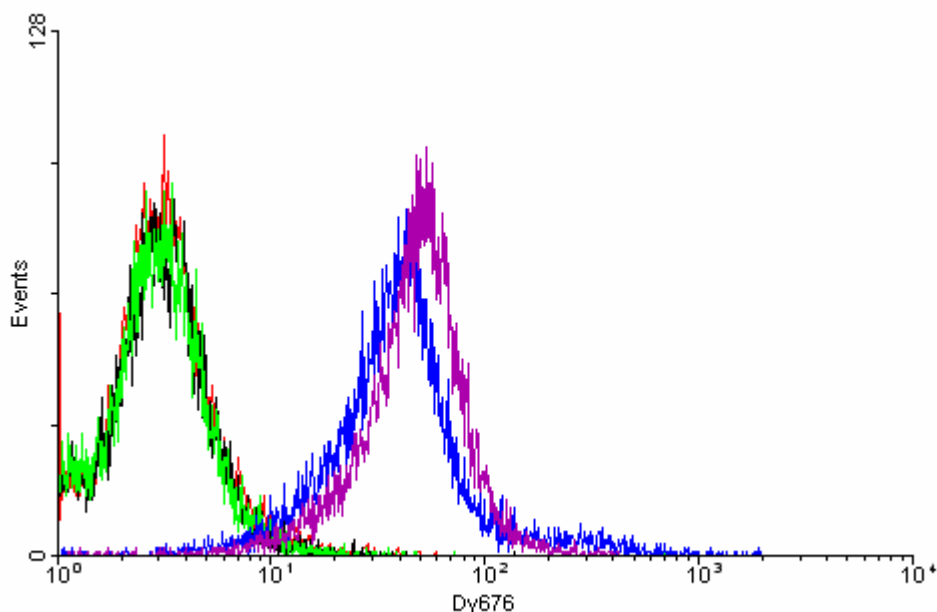
Die Untersuchung des Einflusses der Oberfläche der Liposomen auf die Aufnahme in Makrophagen mittels optischem Bildgebungssystem bonSAI zeigten, dass deutlich erhöhte Fluoreszenzintensitäten der Zellen vorliegen, die mit DY-676-markierten Liposomen inkubiert wurden (Abbildung 20). Der Unterschied zwischen mit DY-markierten und nicht DY-markierten Grundliposomen inkubierten Makrophagen ist statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Die höchsten Fluoreszenzintensitäten wurden in Zellen gemessen, die mit Grund-DY-Liposomen markiert wurden ( $1385,6 \pm 292,4$  b. E. und für Mal-PEG-DY-Liposomen  $1027,9 \pm 337,7$  b. E., alle Werte bei 2s Belichtung). Die Zellen allein wiesen bereits eine Grundfluoreszenz von  $125,3 \pm 4,8$  b. E. auf. Die Zellen, die mit unmarkierten Liposomen inkubiert wurden, zeigten Fluoreszenzintensitäten, die im Bereich der Eigenfluoreszenz der Zellen lagen (Abbildung 20).



**Abbildung 20:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Liposomenformulierung ermittelten Fluoreszenzintensitäten von jeweils  $2 \times 10^6$  Makrophagen (ROI-basiert). Die Untersuchung wurde mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 2 s, mit automatischer Korrektur, BF 2,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15$  nm,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15$  nm) nach zweistündiger Inkubation mit 150 nmol der jeweiligen Liposomenformulierung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. \*  $p < 0,05$ .

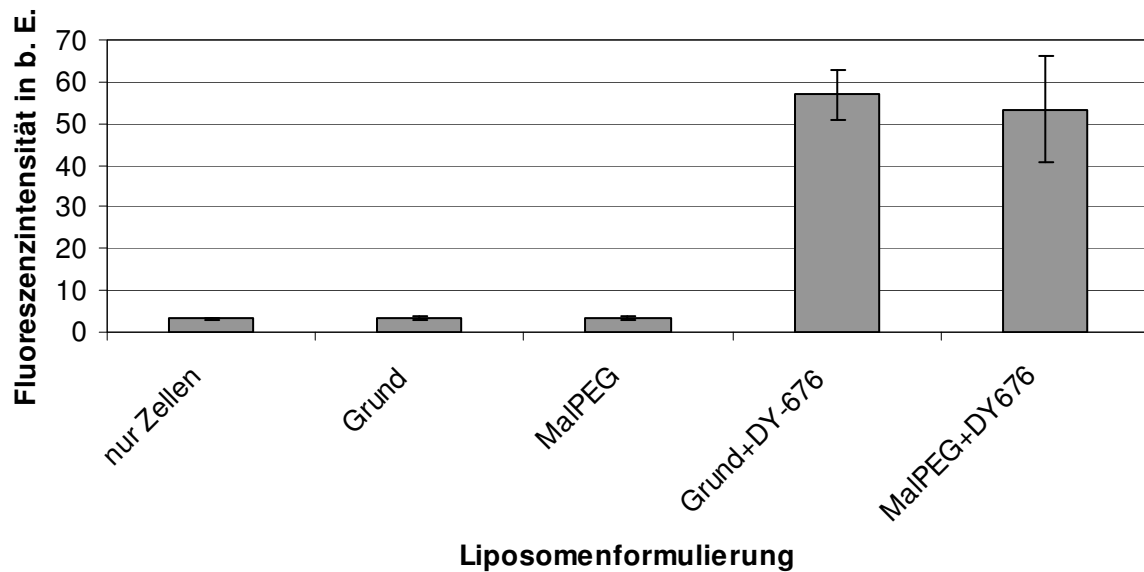
Die Überprüfung der mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI ermittelten Ergebnisse mittels FACS-Analyse bestätigte die Messungen mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (Abbildung 21), wenngleich der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen den beiden mit DY-beladenen Liposomen inkubierten Zellen weniger deutlich war (Abbildung 21, blau- bzw. violettfarbene Kurve).



**Abbildung 21:**

Repräsentative Histogramm-Blots der FACS-Analyse von Makrophagen, die mit unterschiedlichen Liposomenformulierungen inkubiert wurden. [**Schwarz**]: Histogramm-Blot von unbehandelten Makrophagen (Kontrolle 1); [**Rot**]: mit unmarkierten Grundliposomen inkubierte Zellen (Kontrolle 2); [**Grün**]: mit unmarkierten MalPEG- Liposomen inkubierte Zellen (Kontrolle 3); [**Blau**]: mit DY-676- markierten Grundliposomen inkubierte J774-Makrophagen [**Violett**]: mit DY-676- markierten MalPEG-Liposomen inkubierte Makrophagen.

Die graphische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten von 10000 gemessenen Partikeln lässt die höchsten Fluoreszenzintensitäten in Makrophagen erkennen, die mit Grund-DY-Liposomen inkubiert worden waren (Abbildung 22).

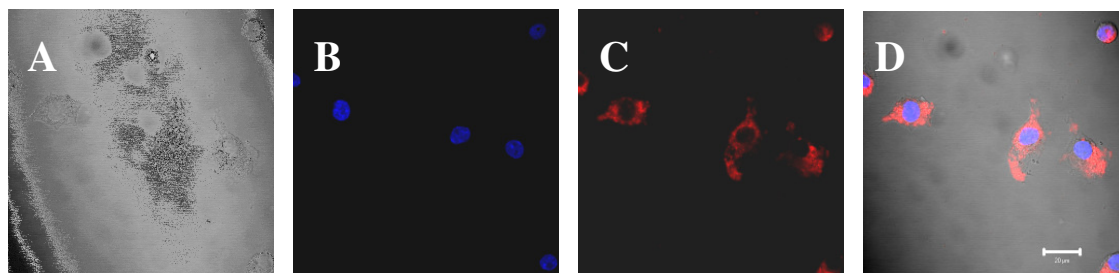


**Abbildung 22:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Liposomenformulierung ermittelten Fluoreszenzintensitäten von Makrophagen mittels FACS-Analyse. Die Untersuchung wurde im Anschluss an die Messungen mit dem biooptischen Bildgebungssystem bonSAI nach zweistündiger Inkubation mit 150 nmol der jeweiligen Liposomenformulierung durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

#### 4.2.2 Konfokale Laser-Scan-Mikroskopie

Die Untersuchung der Lokalisation und Verteilung der Liposomen in den Makrophagen mit dem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop eine deutliche Darstellung der Zellkerne mittels DAPI- Färbung (Abbildung 23B). Die DY-676-markierten Grundliposomen finden sich angereichert in Kompartimenten im gesamten Zytoplasma (Abbildung 23C). In 22D ist noch einmal eine Kombination aller Farben zu sehen.



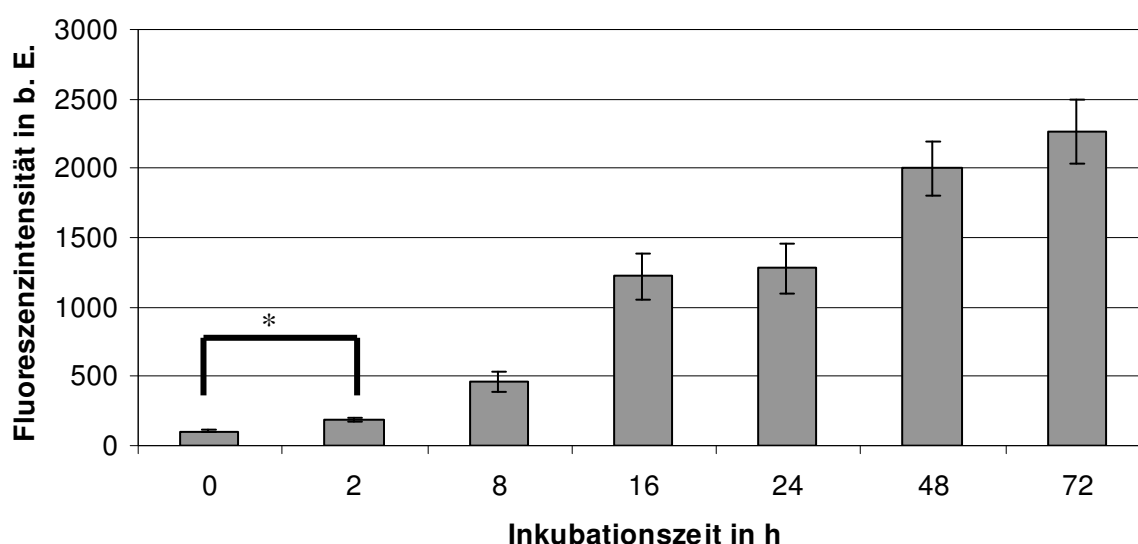
**Abbildung 23:**

Repräsentative CLSM-Aufnahmen von Makrophagen nach Inkubation mit Grund-DY-Liposomen. [A]: Durchlichtaufnahme; [B]: Darstellung der Zellkerne mit DAPI- Färbung (blau); [C]: Darstellung der Grund-DY-Liposomen in Makrophagen (rot); [D]: Kombination aller Farben. Messbalken: 20  $\mu\text{m}$ .



### 4.2.3 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von mit DY-676-beladenen Liposomen markierten Makrophagen von der Inkubationszeit

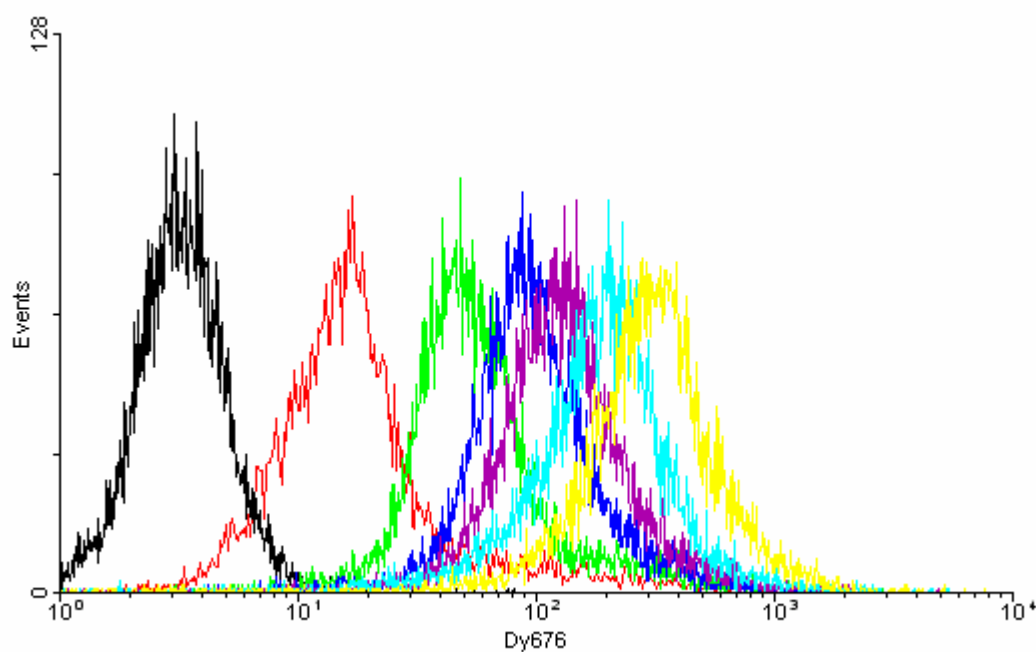
Die Untersuchung des Einflusses der Inkubationszeit auf die Fluoreszenzintensitäten der mit Liposomen markierten Makrophagen zwischen 0 und 72 Stunden (siehe 3.7.2) mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI zeigt, dass die Makrophagen (jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen) alleine bereits eine Eigenfluoreszenz aufwiesen ( $108,0 \pm 1,6$  b. E., BZ 2s). Nach zweistündiger Inkubation mit Liposomen zeigte sich bereits eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität ( $190,6 \pm 17,8$  b. E., BZ 2s;  $p < 0,05$ ). Nach achtstündiger Inkubation war diese nochmals deutlich erhöht und bis 72 Stunden zeigte sich eine weitere Erhöhung der Signalintensitäten ( $460,4 \pm 74,9$  bis  $2267,7 \pm 231,7$  b. E.; BZ 2s) (Abbildung 24).



**Abbildung 24:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten von jeweils  $1 \times 10^6$  Makrophagen (ROI-basiert). Die Zellen wurden für 0, 2, 8, 16, 24, 48 und 72 Stunden mit 150 nmol Grund-DY-Liposomen inkubiert und mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 2 s, mit automatischer Korrektur, BF 2,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15$  nm,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15$  nm) analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. \*  $p < 0,05$ .

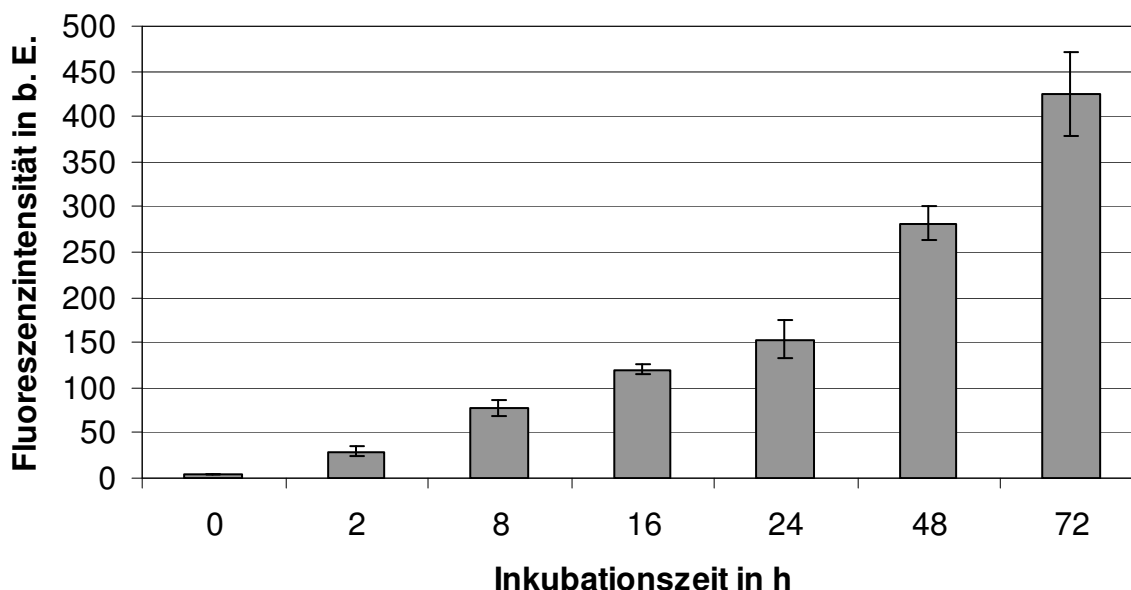
Die im Anschluss durchgeführte FACS-Analyse bestätigte die mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI gewonnenen Ergebnisse. Man erkennt einen Anstieg der Fluoreszenzintensitäten der Makrophagen bis 72 h ( $4,0 \pm 0,4$  b. E. bis  $425,2 \pm 46,6$  b. E.). Bereits nach achtstündiger Inkubationszeit zeigte sich eine Markierung von 99% der Zellen (Abbildung 25).



**Abbildung 25:**

Repräsentative Histogramm-Blots der FACS-Analyse von Makrophagen, die zwischen 0 und 72 Stunden mit 150 nmol Grund-DY-Liposomen inkubiert wurden. **[Schwarz]**: Inkubationszeit 0 Stunden (Kontrolle); **[Rot]**: Inkubationszeit 2h; **[Grün]**: Inkubationszeit 8h; **[Blau]**: Inkubationszeit 16h; **[Violett]**: Inkubationszeit 24h; **[Hellblau]**: Inkubationszeit 48h; **[Gelb]**: Inkubationszeit 72h.

Die semiquantitative Auswertung der im FACS ermittelten Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zeigt eine kontinuierliche Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten der *J774*-Zellen von 0 bis 72 Stunden (Abbildung 26).

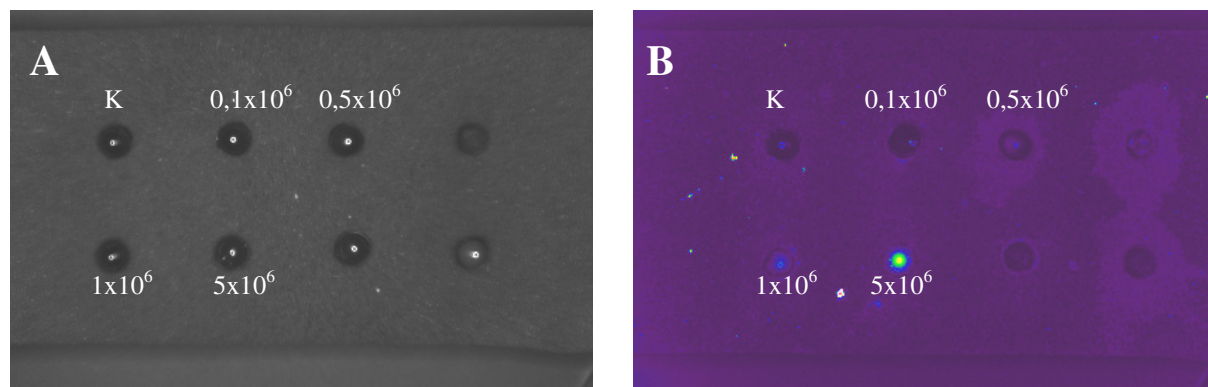


**Abbildung 26:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Inkubationszeit ermittelten Fluoreszenzintensitäten von Makrophagen mittels FACS-Analyse. Die Untersuchung wurde im Anschluss an die Messungen mit dem biooptischen Bildgebungssystem bonSAI nach Inkubation mit 150 nmol Grund-DY-Liposomen durchgeführt. Die Zellen wurden 0, 2, 8, 16, 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

#### 4.2.4 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Makrophagenkonzentration

Die Ermittlung der kritischen Zellkonzentration mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI zeigte neben der schwachen Eigenfluoreszenz der Makrophagen und der ebenfalls sehr schwach ausgeprägten Fluoreszenz der  $0,1 \times 10^6$  Zellen eine demgegenüber leichte Erhöhung des Signals der  $0,5 \times 10^6$  Zellen. Die  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  Zellen dagegen zeigen eine deutlichere Fluoreszenz als niedrigere Zellkonzentrationen (Abbildung 27B).

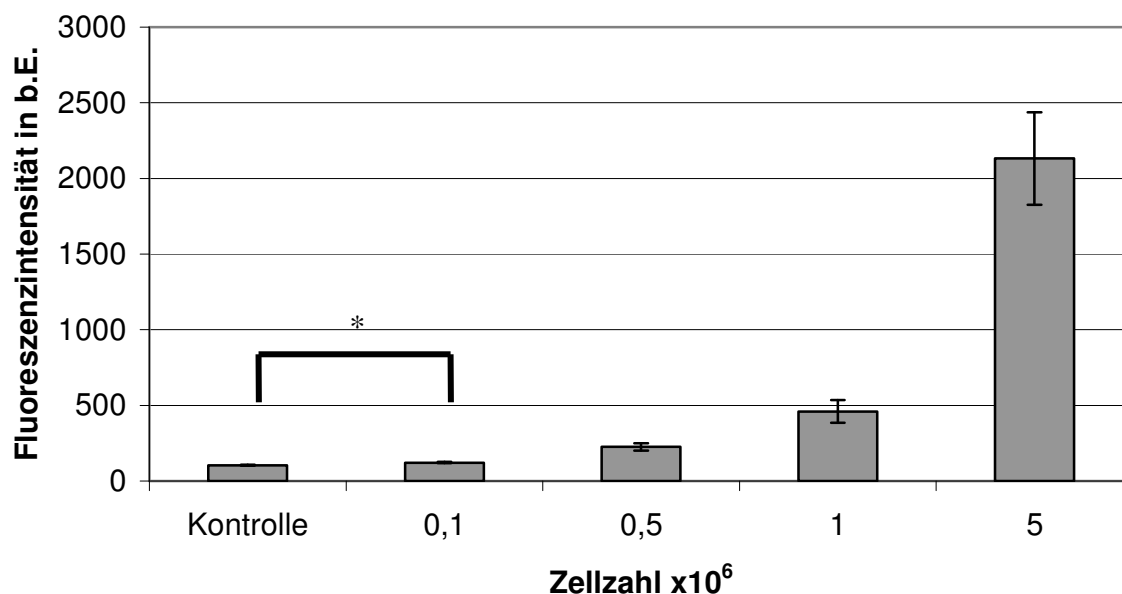


**Abbildung 27:**

Repräsentative Aufnahmen zur Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zellkonzentration mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. **[A]**: Weißlichtbild (BZ 0,3 s; BF 2), **[B]**: NIR-Fluoreszenzbild (BZ 2 s; mit automatischer Korrektur; BF 2;  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$  und  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ). Die Zellen wurden mit 150 nmol Grund-DY-Liposomen für 8h inkubiert. Als Kontrolle (K) dienen unbehandelte Makrophagen. Es wurden die Zellzahlen  $0,1 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  untersucht.

Die semiquantitative Auswertung der Messungen mit dem optischen Kleintierscanner bonSAI ergab eine schwache Eigenfluoreszenz der unbehandelten Makrophagen ( $105,1 \pm 3,0$  b. E.; BZ 2s) (Abbildung 28). Bei den mit Liposomen inkubierten Zellen erhöht sich die Fluoreszenzintensität mit steigender Zellzahl von  $0,1$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen ( $122,13 \pm 3,40$  b. E. bis  $2132,03 \pm 305,87$  b. E.; BZ 2s) (Abbildung 28).

Die statistische Auswertung mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben ergab einen signifikanten Unterschied zu nicht mit Liposomen inkubierten Zellen (=Kontrolle) bereits ab einer Zellzahl von  $0,1 \times 10^6$  ( $p < 0,05$ ).

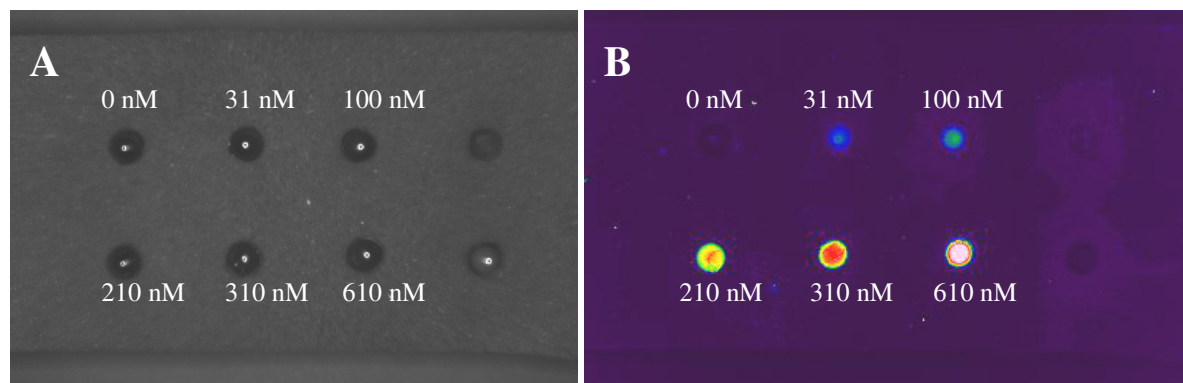


**Abbildung 28:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Makrophagenkonzentration ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Die Zellen wurden für 8 Stunden mit 150 nmol Grund-DY-Liposomen inkubiert und mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 2 s, mit automatischer Korrektur, BF 2,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ) analysiert. Es wurden die Zellzahlen  $0,1 \times 10^6$ ;  $0,5 \times 10^6$ ;  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  analysiert. Als Kontrolle dienten nicht mit Liposomen inkubierte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2.5 Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der Liposomen im Medium

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der den Makrophagen zugegeben Liposomenmenge, d. h. die Ermittlung der kritischen Liposomenmenge mit optischen Bildgebungssystem bonSAI ergab neben der schwachen Eigenfluoreszenz der Zellen eine demgegenüber erhöhte Fluoreszenz der Zellen, die mit 31 nM liposomalem DY-676 inkubiert wurden. Mit zunehmender Liposomenkonzentration, d.h. liposomaler DY-676-Konzentration, zeigt sich eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals (Abbildung 29). Eine liposomale DY-676-Konzentration von 610 nM führt zu einem Signal, das an der oberen Grenze der Falschfarbenskala (siehe Abbildung 8) zu finden ist.

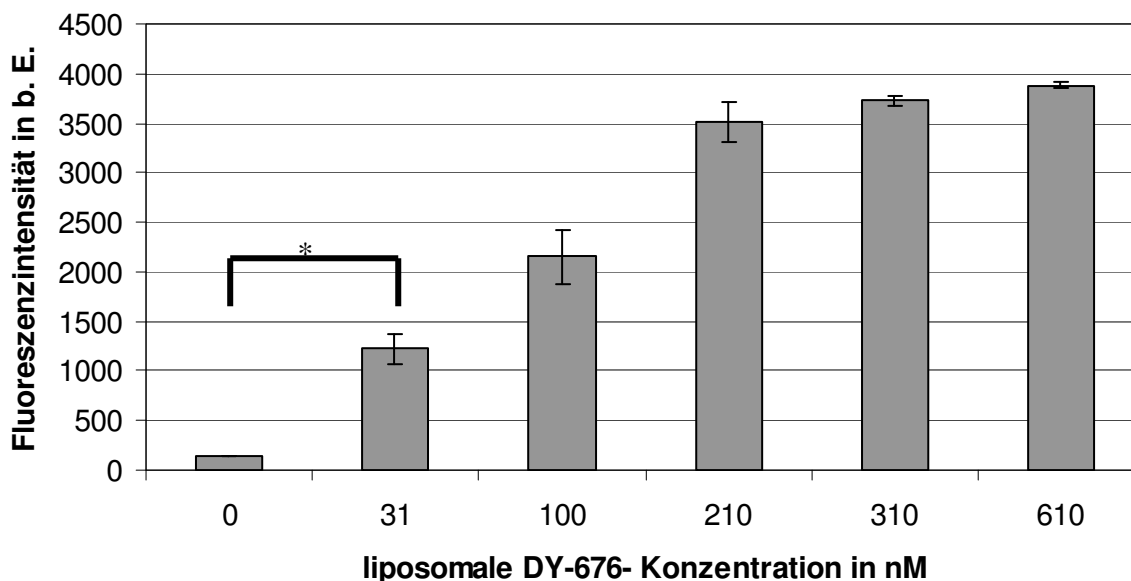


**Abbildung 29:**

Repräsentative Aufnahmen zur Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der liposomalen DY-676-Konzentration mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. **[A]**: Weißlichtbild (BZ 0,3 s; BF 2), **[B]**: NIR-Fluoreszenzbild (BZ 2 s; mit automatischer Korrektur; BF 2;  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15$  nm). Die Zellen wurden mit Grund-DY-Liposomen für 8h inkubiert. Als Kontrolle dienten  $5 \times 10^6$  unbehandelte Makrophagen (0 nM). Die Zellen wurden mit liposomalen DY-676-Konzentrationen von 31, 100, 210, 310 und 620 nM inkubiert und auf  $5 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung eingestellt.

Die semiquantitative Auswertung zeigt die schwache Eigenfluoreszenz der Zellen mit  $145,8 \pm 3,4$  b. E. (BZ 2 s), von der sich die mit 31 nM liposomalem DY-676 inkubierten Makrophagen mit  $1225,8 \pm 148,7$  b. E. (BZ 2 s) bereits deutlich unterscheiden. Bis zu einer liposomalen DY-676-Konzentration von 610 nM erhöht sich die Fluoreszenzintensität weiter bis auf  $3877,9 \pm 26,8$  b. E. (BZ 2 s) (Abbildung 30).

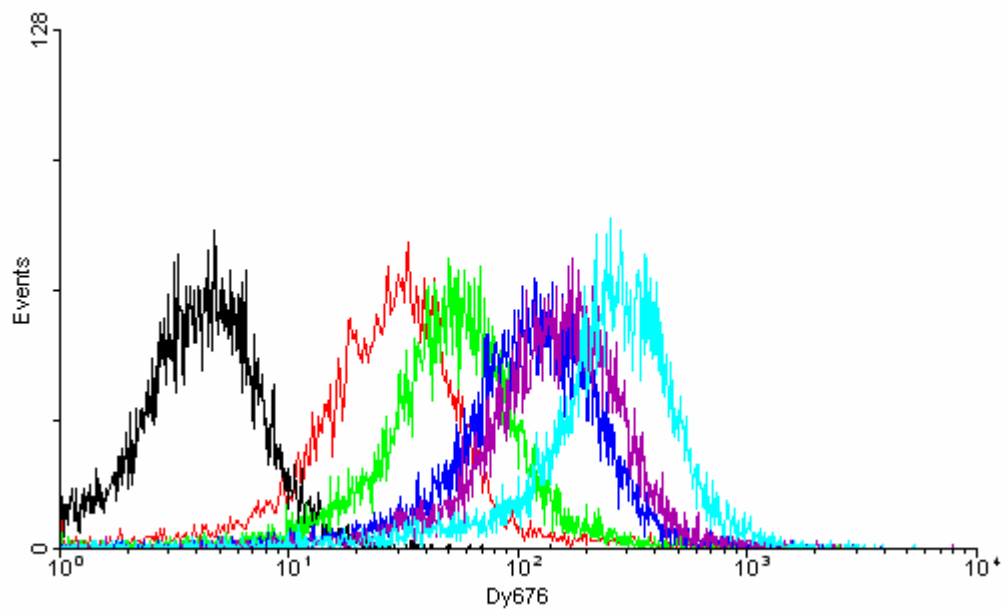
Die statistische Auswertung mittels Student's t-Test ergab einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten Zellen (0 nM) und mit 31 nM liposomalem DY-676 behandelten J774-Makrophagen ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 30:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der liposomalen DY-676-Konzentration ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Die Zellen wurden für 16 Stunden mit Grund-DY-Liposomen zu Konzentrationen an liposomalem DY-676 von 31, 100, 210, 310 und 610 nM inkubiert und mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 2 s, mit automatischer Korrektur, BF 2,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ) analysiert. Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. \*  $p < 0,05$ .

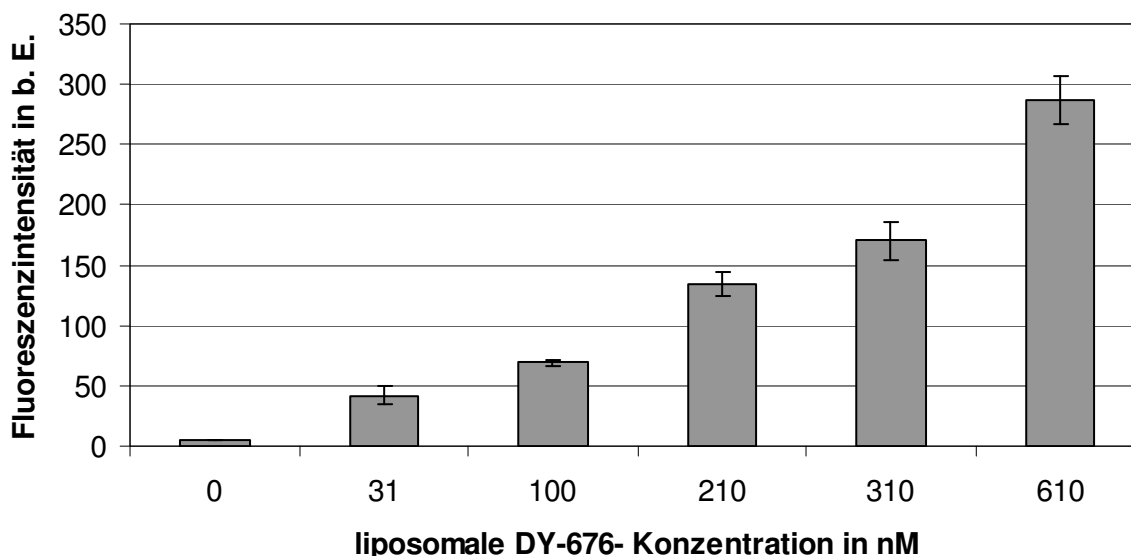
Die Überprüfung der mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI erzielten Ergebnisse mittels Durchflusszytometrie (FACS) zeigt in Form von Histogramm-Blots zunächst die Fluoreszenzintensität von unbehandelten Makrophagen (Kontrolle) (Abbildung 31, schwarzfarbener Graph). Es zeigte sich, dass mit ansteigender liposomaler DY-676-Konzentration höhere Fluoreszenzintensitäten resultierten (Abbildung 31, farbige Graphen). Somit konnten mit der FACS-Analyse die Messungen mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI bestätigt werden.

**Abbildung 31:**

Repräsentative Histogramm-Blots der FACS-Analyse von Makrophagen, die mit Grund-DY-Liposomen in unterschiedlicher Konzentration inkubiert wurden. [**Schwarz**]: unbehandelte Makrophagen (Kontrolle); [**Rot**]: 31 nM liposomaler DY-676; [**Grün**]: 100 nM liposomaler DY-676; [**Blau**]: 210 nM liposomaler DY-676; [**Violett**]: 310 nM liposomaler DY-676; [**Hellblau**]: 610 nM liposomaler DY-676.

Die semiquantitative Auswertung der FACS-Analyse zeigt eine schwache Eigenfluoreszenz der Makrophagen von  $5,0 \pm 0,5$  b. E.. Davon unterscheiden sich deutlich die Zellen, die mit 31 nM liposomalem DY-676 inkubiert wurden ( $41,8 \pm 7,1$  b. E.). Mit weiter ansteigender liposomaler DY-676-Konzentration erhöht sich auch die Fluoreszenzintensität weiter (bis  $286,9 \pm 20,0$  b. E bei 610 nM) (Abbildung 32).





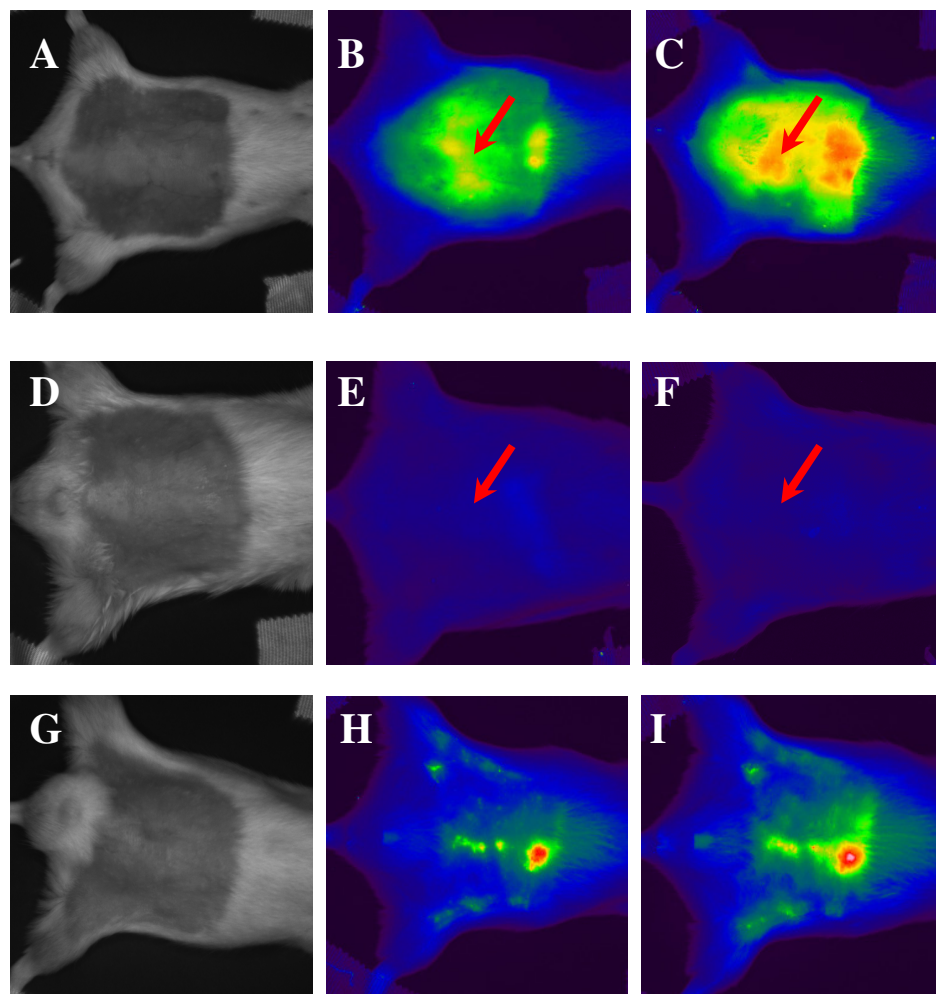
**Abbildung 32:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der liposomalen DY-676-Konzentration ermittelten Fluoreszenzintensitäten von Makrophagen mittels FACS-Analyse. Die Untersuchung wurde im Anschluss an die Messungen mit dem biooptischen Bildgebungssystem bonSAI nach Inkubation mit 0, 31, 100, 210, 310 und 610 nM liposomalem DY-676 durchgeführt. Die Zellen wurden 16 Stunden inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

## 4.3 *In vivo*-Versuche

### 4.3.1 *In vivo*-NIR-Fluoreszenz-Bildgebung einer Peritonitis

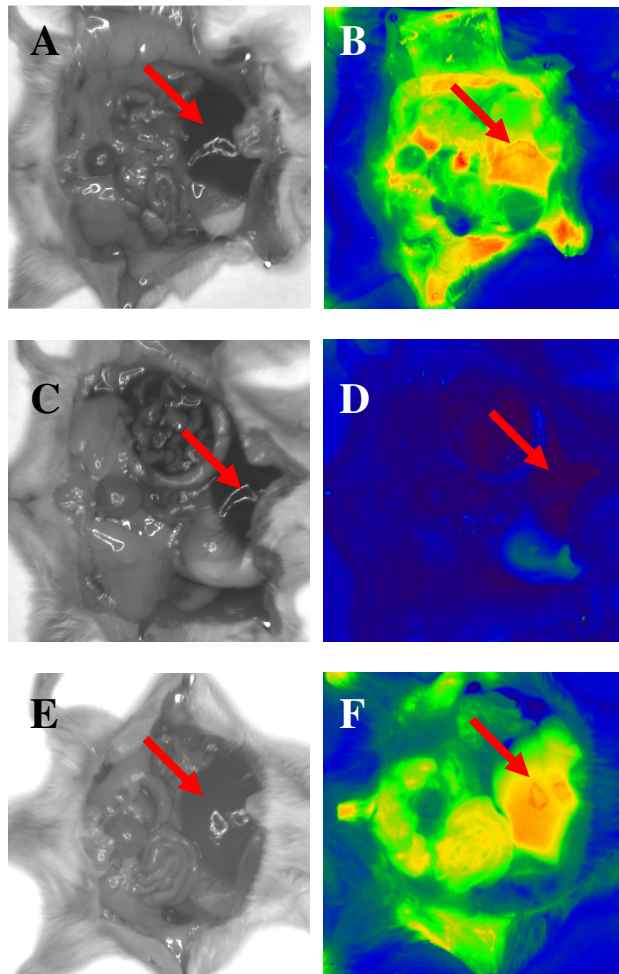
Die bildgebende Untersuchung einer Peritonitis am Mausmodell mit dem optischen Kleintierscanner bonSAI und einem liposomalen DY-676-haltigen Kontrastmittel über einen Zeitraum von 48 Stunden zeigte, dass bei Tieren der Gruppe A (Zymosan +; Kontrastmittel +) 6 Stunden nach Beginn der Behandlung eine deutliche Fluoreszenz im Abdominalbereich auftritt. Diese Fluoreszenz besteht aus einem größerflächigen Signal im Bereich der Darmschlingen und einem kleinerflächigen Signal kranial von diesem. Nach 48 Stunden sind beide Signale verstärkt und gehen ineinander über, sodass eine Unterscheidung der beiden nur schwierig möglich ist (Abbildung 33A bis C). Die NIRF-Aufnahmen der Mäuse der Gruppe B (Zymosan +; KM -) zeigen sowohl nach 6 als auch nach 48 Stunden eine Grundfluoreszenz des Gewebes, die aber deutlich geringer ausgeprägt ist als die der Tiere der Gruppe A (Abbildung 33D bis F). NIRF-Bilder der Tiere der Gruppe C (Zymosan -, KM +) zeigen, dass nach 6 Stunden eine fokale Fluoreszenz im Bereich, in der sich die Leber befindet, auftritt, die nach 48 Stunden (33I) noch etwas deutlicher ausgeprägt ist (Abbildung 33H bis I).



**Abbildung 33:**

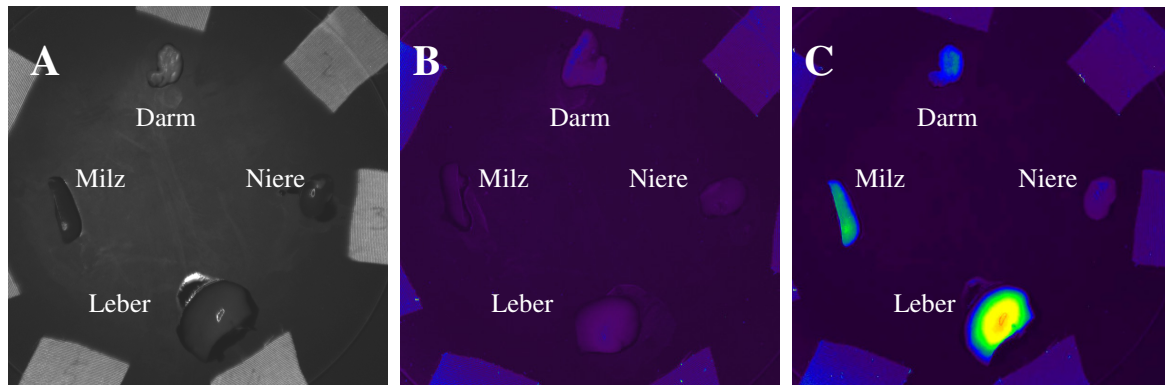
Repräsentative *in vivo*-Aufnahmen von Mäusen mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. Linke Spalte: Weißlichtaufnahmen (BZ 0,3 s, BF1), mittlere Spalte: NIRF-Aufnahmen 6h nach Gabe des Zymosans und/oder Kontrastmittels, rechte Spalte: NIRF-Aufnahmen 48h nach Gabe des Zymosans (1%; 500µl i. p.) und/oder Kontrastmittels (55 nmol liposomaler DY-676/kg KG i. v.) (BZ 3 s; mit automatischer Korrektur; BF 1;  $\lambda_{\text{Absorption}}$  660±15 nm und  $\lambda_{\text{Emission}}$  735±15 nm). Der rote Pfeil markiert die Stelle der Zymosaninjektion. **A bis C:** Aufnahmen der Mäuse, die sowohl Zymosan A als auch Kontrastmittel injiziert bekamen (Gruppe A); **D bis F:** Aufnahmen der Mäuse, die nur Zymosan A bekamen (Gruppe B); **G bis I:** Aufnahmen der Mäuse, die nur Kontrastmittel bekamen (Gruppe B).

Die Darstellung der Organe *in situ* mit optischen Kleintierscanner bonSAI lies bei den Tieren, denen sowohl das Zymosan, als auch das Kontrastmittel verabreicht wurde (Gruppe A), eine deutliche Fluoreszenz sowohl im Bereich der Darmschlingen, als auch im Bereich der Leber erkennen (Abbildung 34B). Die Mäuse, denen lediglich das Zymosan injiziert worden war (Gruppe B) zeigen weder im Bereich des Darmes noch der Leber deutliche Fluoreszenzsignale (Abbildung 34D). Bei den Tieren, denen nur das Kontrastmittel appliziert wurde (Gruppe C), ist ebenfalls im der Region der Darmschlingen ein erhöhtes Fluoreszenzsignal zu erkennen, daneben zeigt sich jedoch auch ein demgegenüber erhöhtes Signal der Leber (Abbildung 34F).

**Abbildung 34:**

Repräsentative *in situ*-Aufnahmen von eröffneten Bauchseiten von Mäusen mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. Linke Spalte: Weißlichtaufnahmen (BZ 0,3 s; BF1), rechte Spalte: NIRF-Aufnahmen 48 h (B und D) bzw. 6 h (F) nach Gabe des Kontrastmittels (55 nmol liposomaler DY-676/kg KG i. v.) und/oder Zymosans (1%, 500  $\mu$ l i. p.) (BZ 3 s; BF1;  $\lambda_{\text{Absorption}}$  660 $\pm$ 15 nm und  $\lambda_{\text{Emission}}$  735 $\pm$ 15 nm). [A] und [B]: Aufnahmen der Mäuse, die sowohl das Zymosan als auch das Kontrastmittel appliziert bekamen (Gruppe A); [C] und [D]: Aufnahmen von Mäusen, denen nur Zymosan appliziert wurde (Gruppe B); [E] und [F]: Aufnahmen von Mäusen, denen nur das Kontrastmittel injiziert wurde (Gruppe C). Der rote Pfeil kennzeichnet jeweils die Leber.

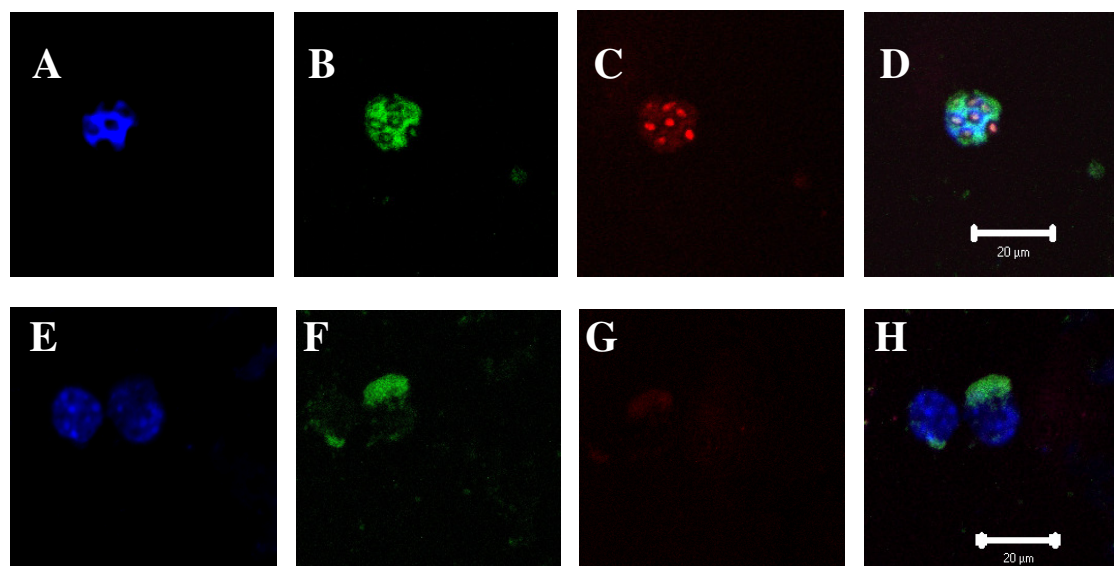
Die Untersuchung der präparierten Organe mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI zeigte eine schwache Eigenfluoreszenz der Organe bei Tieren der Gruppe B (Zymosan +; KM -) (Abbildung 35B). Die Analyse der Organe einer Maus, der sowohl Zymosan als auch das Kontrastmittel appliziert worden war (Gruppe A), zeigte eine erhöhte Fluoreszenz in Leber, Milz und Darm, wobei das Signal der Leber am stärksten ist (Abbildung 35C).



**Abbildung 35:**

Repräsentative Aufnahmen der Organe einer Maus mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI [A]: Weißlichtaufnahme (BZ 0,3 s, BF1); [B]: NIRF-Aufnahme 48 h nach erfolgter Peritonitisinduktion ohne Kontrastmittelgabe (BZ 3 s; mit automatischer Korrektur; BF 1;  $\lambda_{\text{Absorption}}$  660±15 nm und  $\lambda_{\text{Emission}}$  735±15 nm); [C]: NIRF-Aufnahme 48 h nach Peritonitisinduktion (1%, 500 µl i. p.) und Kontrastmittelgabe (55 nmol liposomaler DY-676/kg KG i. v.) (BZ 3 s; mit automatischer Korrektur; BF 1;  $\lambda_{\text{Absorption}}$  660±15 nm und  $\lambda_{\text{Emission}}$  735±15 nm).

Die Analyse der durch Peritoneallavage isolierten Zellen mittels CLSM zeigt die Lokalisation des Gewebsmakrophagen-spezifischen Antikörpers F4/80-FITC zur Identifikation der Makrophagen (Abbildung 36B). Dieser ist homogen über das gesamte Zytoplasma verteilt. Die Lokalisation der DY-676-markierten Liposomen innerhalb der Zelle zeigt, dass sich diese in Form von Kompartimenten in der Zelle anreichern (Abbildung 36C). Die Kombination der 3 Farben lässt erkennen, dass F4/80 und Liposomen nicht kolokalisiert sind (Abbildung 36D). Die CLSM-Aufnahmen der Makrophagen aus Mäusen, denen kein Kontrastmittel injiziert worden war, zeigen die homogene Verteilung von F4/80 und keine Fluoreszenz im Wellenlängenbereich des DY-676 (Abbildung 36E bis H).



**Abbildung 36:**

Repräsentative CLSM-Aufnahmen von murinen Peritonealmakrophagen. **A bis D:** Peritonealmakrophagen aus Mäusen, denen sowohl Zymosan (1%, 500 µl i. p.) als auch Kontrastmittel (55 nmol liposomaler DY-676/kg KG i. v.) injiziert worden war; **E bis H:** Peritonealmakrophagen aus Mäusen, denen nur das Zymosan injiziert worden war. **[A]:** Darstellung der Zellkerne mit DAPI- Färbung (blau); **[B]:** Darstellung des Gewebsmakrophagen-spezifischen Antikörpers F4/80-FITC (grün); **[C]:** Darstellung der Grund-DY- Liposomen in Makrophagen (rot); **[D]:** Kombination aller Farben. Messbalken: 20 µm.

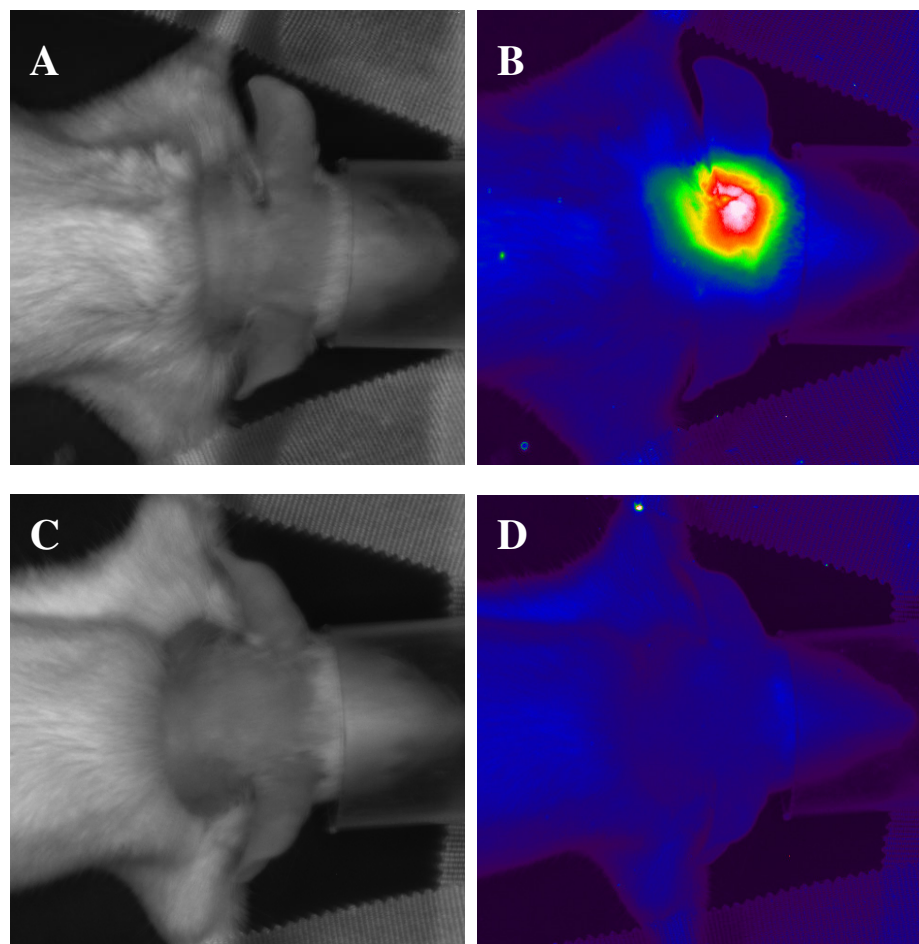
**[E]:** Darstellung der Zellkerne mit DAPI- Färbung (blau); **[F]:** Darstellung des Gewebsmakrophagen-spezifischen Antikörpers F4/80-FITC (grün); **[G]:** Darstellung der Grund-DY- Liposomen in Makrophagen (rot); **[H]:** Kombination aller Farben. Messbalken: 20 µm.

Die Verwendung von pegylierten Liposomen zur Untersuchung einer veränderten Aufnahme der Vesikel in die Leber zeigte, dass die Anreicherung in der Leber etwas verringert werden konnte, das Lebersignal, das mit dem Kleintierscanner bonSAI detektiert wurde, war aber dennoch so stark ausgeprägt, dass eine Unterscheidung vom Peritonitissignal nicht möglich war (Daten nicht dargestellt).

#### 4.3.2 *In vivo*-NIR-Fluoreszenz-Bildgebung eines Ohrödems

Bei der bildgebenden Untersuchung eines Ohrödems als zweites Entzündungsmodell war eine deutliche Fluoreszenz im Bereich des linken Ohres der Tiere zu verzeichnen, denen sowohl Zymosan appliziert als auch das Kontrastmittel injiziert wurde (Gruppe A). Das rechte Ohr zeigt eine schwache Fluoreszenz (Abbildung 37B). Die NIRF-Aufnahme (6 h p. i., BZ 6s) einer Maus der Gruppe B (Zymosan -; KM +) zeigt sowohl im Bereich des rechten als auch des linken Ohres eine schwache Grundfluoreszenz des Gewebes (Abbildung 37D).





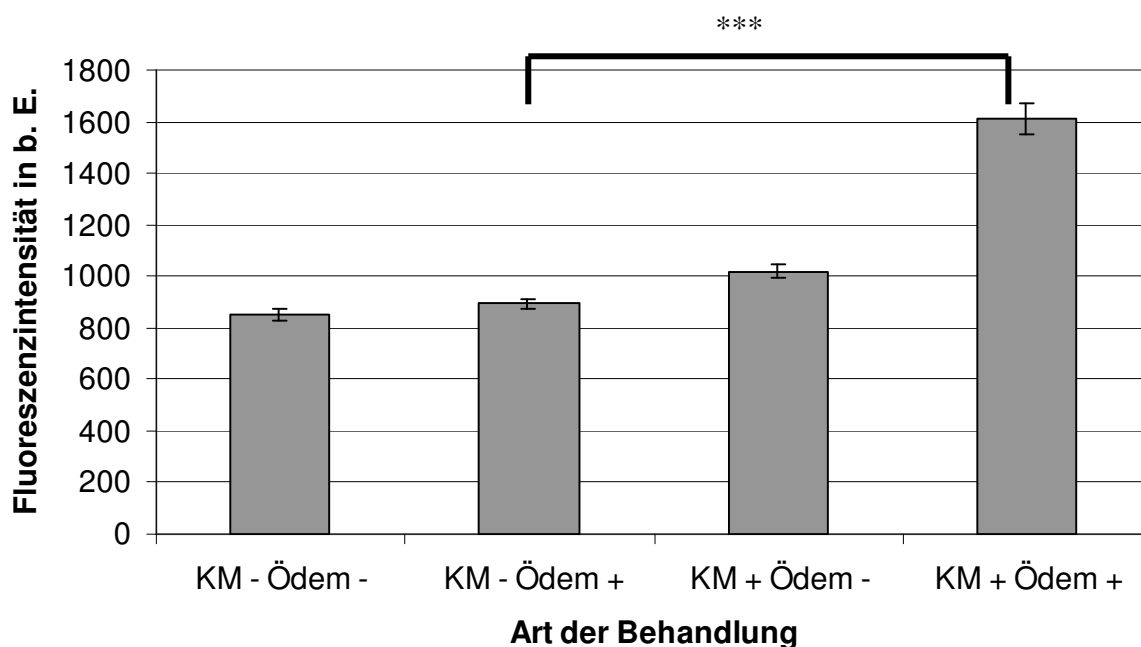
**Abbildung 37:**

Repräsentative *in vivo*-Aufnahmen von Mäusen mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. Linke Spalte: Weißlichtaufnahmen (BZ 0,3 s, BF1), rechte Spalte: NIRF-Aufnahmen 6 h nach Gabe des Zymosans (1%, 20  $\mu$ l) und/oder Kontrastmittels (55 nmol liposomaler DY-676/kg KG i. v.) (BZ 6 s; mit automatischer Korrektur; BF 1;  $\lambda_{\text{Absorption}}$  660 $\pm$ 15 nm und  $\lambda_{\text{Emission}}$  735 $\pm$ 15 nm). [A] und [B]: Aufnahmen der Mäuse, die sowohl Zymosan A als auch Kontrastmittel (linkes Ohr) bekamen (Gruppe A); [C] und [D]: Aufnahmen der Mäuse, die nur Zymosan A (linkes Ohr) bekamen (Gruppe B).

Die semiquantitative ROI-basierte Auswertung der Fluoreszenzintensitäten zeigt, dass die unbehandelten rechten Ohren von Mäusen, denen kein Kontrastmittel injiziert wurde, eine schwache Grundfluoreszenz von 853,4 $\pm$ 22,6 b. E. (6 h p. i., BZ 6 s) aufwiesen. Davon unterschieden sich die entzündeten linken Ohren dieser Mäuse nur wenig (892,8 $\pm$ 19,4 b. E., 6 h p. i., BZ 6s). Eine demgegenüber erhöhte Fluoreszenz zeigte sich bei den unbehandelten rechten Ohren der Mäuse, denen das Kontrastmittel injiziert wurde (1018,8 $\pm$ 26,1 b. E., 6 h p. i., BZ 6s). Die höchste Fluoreszenzintensität konnte bei den ödematösen Ohren dieser Mäuse gemessen werden, (1613,6 $\pm$ 61,7 b. E., 6 h p. i., BZ 6s) (Abbildung 38).

Es ergab sich mittels Student's t-Test für unabhängige Stichproben ein signifikanter Unterschied zwischen den ödematösen Ohren der nicht mit Kontrastmittel behandelten Mäuse und den ödematösen Ohren der mit Kontrastmittel behandelten Mäuse ( $p < 0,001$ ).

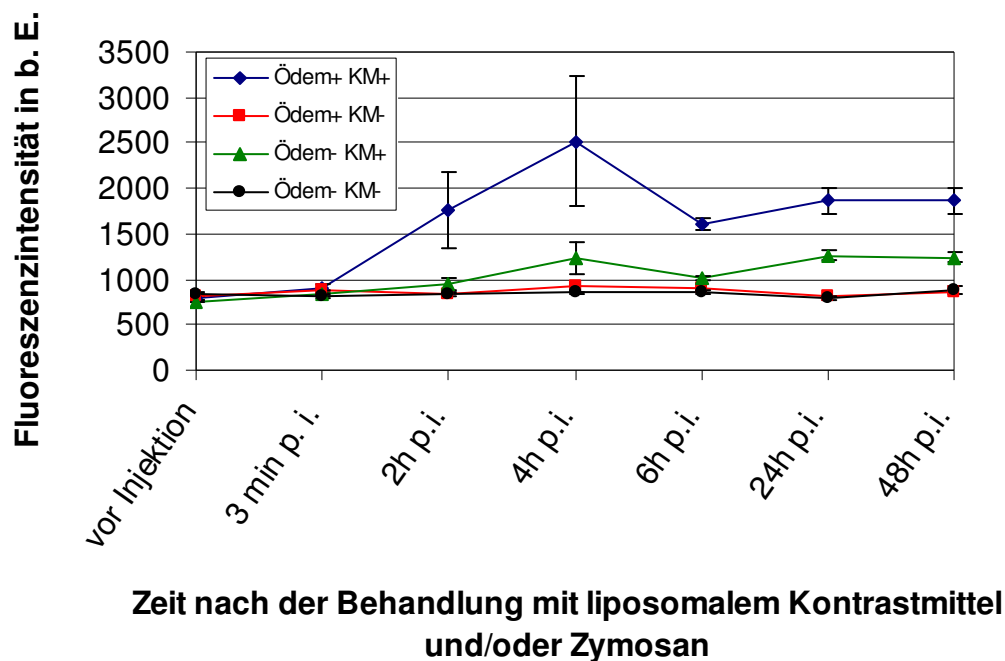
Der t-Test zur Analyse des Unterschiedes zwischen den unbehandelten Ohren der mit Kontrastmittel behandelten Mäuse und den behandelten Ohren derselben Mäuse, ergab mittels Student's t-Test für abhängige Stichproben einen signifikanten Unterschied der Differenz der Mittelwerte von Null ( $p=0,0058$ ).



**Abbildung 38:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Behandlung der Mäuse ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Den Tieren wurde am linken Ohr ein Zymosandepot (20 µl) injiziert. Einigen von ihnen wurde i. v. das liposomale Kontrastmittel (55 nmol liposomaler DY-676/kg KG i. v.) injiziert. Die Aufnahmen erfolgten 6 h post injectionem (p. i.) mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 6 s, mit automatischer Korrektur, BF 1,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen mit Standardfehler. \*\*\*  $p < 0,001$ .

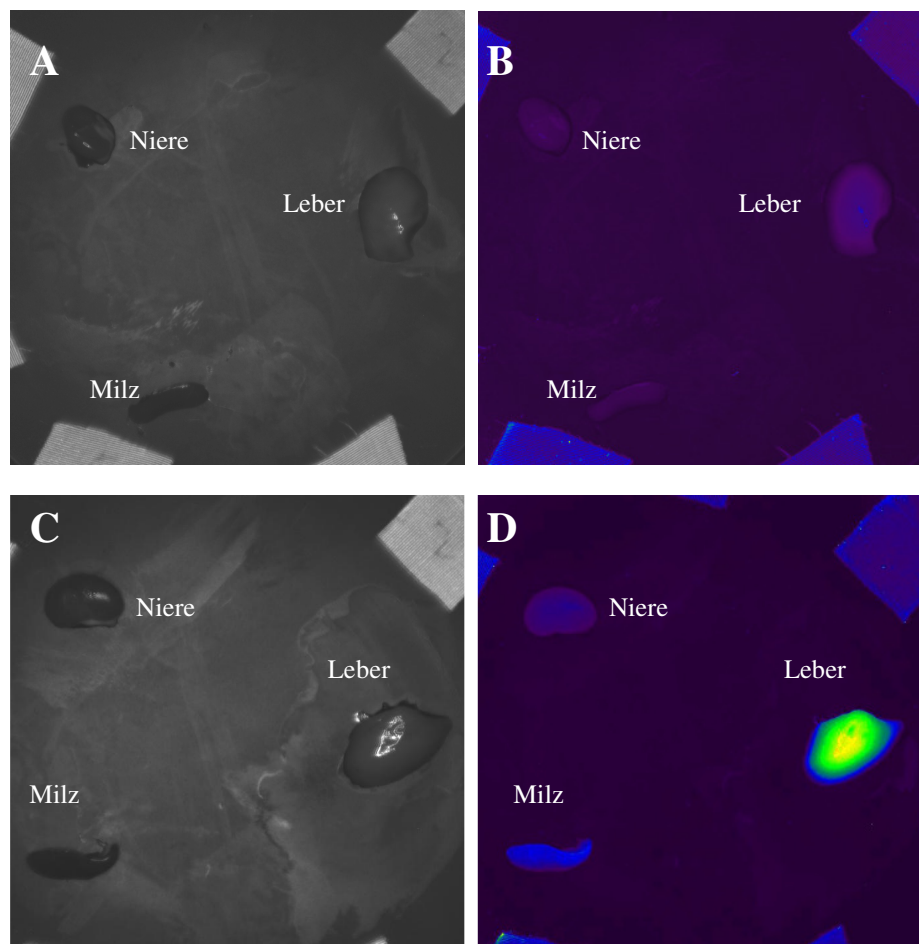
Die semiquantitative ROI-basierte Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Ohren über einen Zeitraum von 48 Stunden ergab bei den ödematösen Ohren der Mäuse, denen das Kontrastmittel injiziert wurde, einen Anstieg der Fluoreszenzintensität bis 4 Stunden nach Gabe des Kontrastmittels und des Zymosans. Ab 4 Stunden nach Beginn der Versuche (Applikation des Kontrastmittels und/oder Zymosans) bis 48 Stunden wurden geringere Fluoreszenzintensitäten gemessen. Bei den Kontrolltieren, denen kein Kontrastmittel injiziert worden war, verhielten sich die Fluoreszenzintensitäten über den gesamten Zeitraum konstant niedrig. Die Kontrolltiere, bei denen kein Ödem induziert wurde, aber die Gabe des Kontrastmittels erfolgte, zeigten bis 4 Stunden post injectionem einen leichten Anstieg der Fluoreszenzintensitäten, danach war keine weitere Änderung der Werte zu verzeichnen (Abbildung 39).

**Abbildung 39:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Zeit nach Versuchsbeginn ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Den Tieren wurde jeweils am linken Ohr ein Zymosandepot injiziert, während das jeweils rechte unbehandelt blieb. Einigen von ihnen wurde i. v. das liposomale Kontrastmittel injiziert. Die Aufnahmen erfolgten unmittelbar vor, 3 min nach, 2 h, 4 h, 6h, 24 h und 48 h nach Injektion des Zymosans und /oder Kontrastmittels. Die Aufnahmen erfolgten mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 6 s, mit automatischer Korrektur, BF 1,  $\lambda_{\text{Absorption}}$   $660 \pm 15$  nm,  $\lambda_{\text{Emission}}$   $735 \pm 15$  nm). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 (vor Injektion, 3 min und 2h p. i. bei Ödem- KM+ und Ödem+ KM+), aus 2 (24 h und 48 h p. i. bei Ödem- KM- und Ödem+ KM-) bzw. 4 (andere) unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Die Untersuchung der Organe Milz, Niere und Leber *ex vivo* mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI zeigte, dass die Organe, die einer Maus entnommen wurden, bei der auf die Gabe des Kontrastmittels verzichtet wurde, eine schwache Grundfluoreszenz aufweisen (Abbildung 40B). Die Analyse der Organe einer Maus, der das Kontrastmittel appliziert wurde lässt eine deutlich erhöhte Fluoreszenz der Leber erkennen, jedoch sind auch die Fluoreszenzen der anderen Organe erhöht (Abbildung 40D).

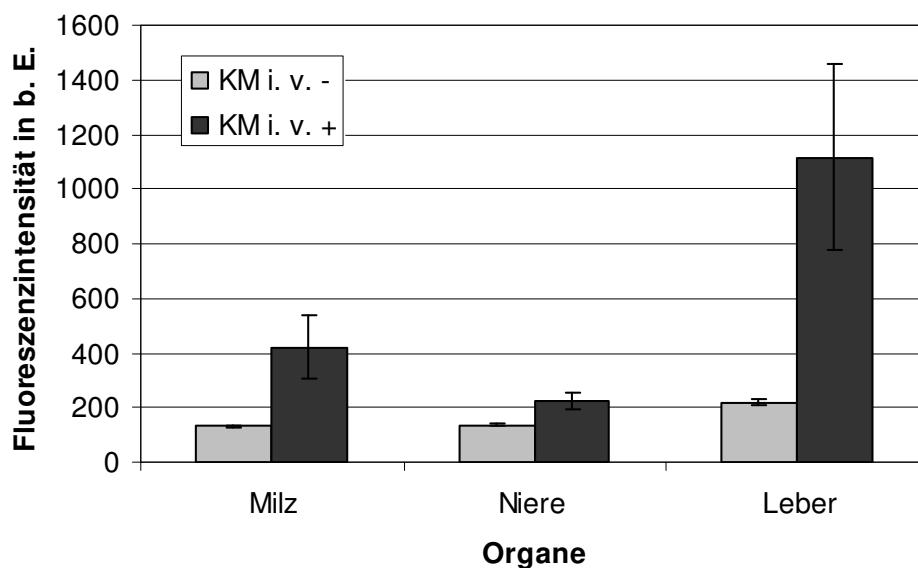




**Abbildung 40:**

Repräsentative Aufnahmen der Organe einer Maus mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI. Linke Spalte: Weißlichtbilder (BZ 0,3 s, BF 1); rechte Spalte NIRF-Aufnahmen 6 h nach Versuchsbeginn (BZ 3 s; mit automatischer Korrektur; BF 1;  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15$  nm und  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15$  nm); [A] und [B]: keine Kontrastmittelinjektion [C] und [D]: mit Kontrastmittelinjektion.

Die semiquantitative Auswertung der Organe ergab bei den Tieren, denen das Kontrastmittel injiziert wurde eine erhöhte Fluoreszenz der Leber gegenüber der Leber von Tieren, denen kein Kontrastmittel appliziert wurde ( $1115,6 \pm 339,6$  b. E. vs.  $220,2 \pm 8,1$  b. E.; BZ 3 s). Die anderen entnommenen Organe zeigten nur ein schwaches Fluoreszenzsignal (Niere: KM+:  $224,2 \pm 31,8$  b. E. vs. KM-:  $138,0 \pm 4,4$  b. E.; Milz: KM+:  $420,9 \pm 114,7$  b. E. vs. KM-:  $131,1 \pm 2,69$  b. E.) (Abbildung 41).

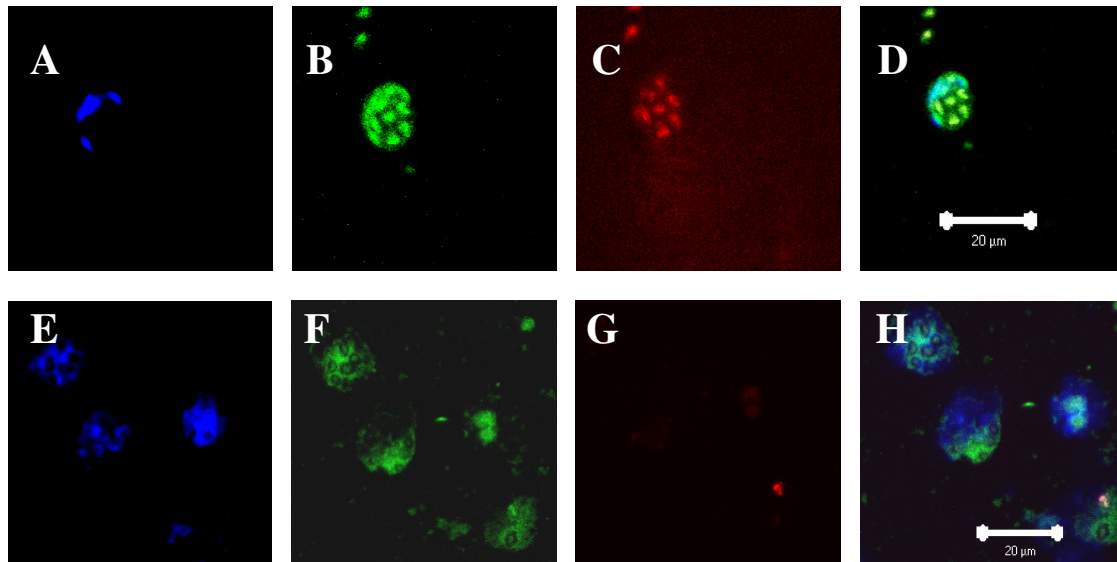


**Abbildung 41:**

Semiquantitative Auswertung der in Abhängigkeit von der Behandlung der Maus ermittelten Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert) der Organe Milz, Niere und Leber. Den Tieren wurde entweder das Kontrastmittel injiziert oder die Injektion wurde nicht durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten 6 h nach Versuchsbeginn mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI (BZ 6 s, mit automatischer Korrektur, BF 1,  $\lambda_{\text{Absorption}} 660 \pm 15 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Emission}} 735 \pm 15 \text{ nm}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 (KM i. v. +) bzw. 2 (KM i. v. -) unabhängigen Versuchen mit Standardfehler.

Die CLSM-Untersuchung der durch Lavage des Ödembereiches isolierten Zellen zeigten eine homogene Anreicherung des FITC-gekoppelten Antikörpers F4/80 im Zytoplasma zur Identifikation der murinen Makrophagen als solche (Abbildung 42B). Des Weiteren zeigt sich eine Akkumulation des liposomalen DY-676-haltigen Kontrastmittels in einzelnen Kompartimenten (Abbildung 42C).

Die CLSM-Aufnahmen der Makrophagen aus Mäusen, denen kein Kontrastmittel injiziert worden war, zeigen die homogene Verteilung von F4/80 und keine Fluoreszenz im Wellenlängenbereich des DY-676 (Abbildung 42F und G).

**Abbildung 42:**

Repräsentative CLSM-Aufnahmen von murinen Makrophagen aus einem Ohrödem. **A bis D:** Makrophagen aus einem Ohrödem von Mäusen, denen sowohl Zymosan (1%, 20 µl) als auch Kontrastmittel (55 nmol liposomaler Dy-676/kg KG) injiziert worden war; **E bis H:** Peritonealmakrophagen aus Mäusen, denen nur das Zymosan injiziert worden war. **[A]:** Darstellung der Zellkerne mit DAPI- Färbung (blau); **[B]:** Darstellung des Gewebsmakrophagen-spezifischen Antikörpers F4/80-FITC (grün); **[C]:** Darstellung der Grund-DY-Liposomen in Makrophagen (rot); **[D]:** Kombination aller Farben. Messbalken: 20 µm.

**[E]:** Darstellung der Zellkerne mit DAPI- Färbung (blau); **[F]:** Darstellung des Gewebsmakrophagen-spezifischen Antikörpers F4/80-FITC (grün); **[G]:** Darstellung der Grund-DY-Liposomen in Makrophagen (rot); **[H]:** Kombination aller Farben. Messbalken: 20 µm.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mit einem neuartigen liposomalen fluorochromhaltigen Kontrastmittel und einem innovativen Detektionssystem in Form des planaren optischen Bildgebungssystems bonSAI eine Nahinfrarot-Bildgebung von Entzündungsprozessen grundsätzlich möglich ist.

Bei den dafür im Vorfeld durchgeführten Vorversuchen konnten die optimalen Bedingungen der Bildgebung mit dem biooptischen Kleintierscanner bonSAI und DY-676-Lösungen bzw. liposomalem DY-676 ermittelt werden. So wurden die Parameter Binningfaktor, automatische Korrektur und Belichtungszeit variiert und ihr Einfluss auf die Fluoreszenzbildgebung analysiert, sodass die passenden Einstellungen für aussagekräftige Ergebnisse ermittelt werden konnten.

### 5.1 Vorversuche

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete neuartige biooptische Kleintierscanner ist, wie sein Name bereits impliziert, für die Bildgebung von Kleintieren konzipiert und nicht unbedingt für einen Einsatz in *in vitro*-Untersuchungen. Dennoch wurden hier zunächst die grundlegenden Bedingungen der Bildgebung mit dem bonSAI ermittelt, was mit Hilfe von Farbstofflösungen und später von Zellsuspensionen realisiert wurde. Ein wesentliches Problem bei wässrigen Lösungen stellen die Reflexionen dar, die aufgrund der glatten Oberflächen auftreten, und die als scheinbare Fluoreszenzintensität detektiert werden. Um nun trotz allem Untersuchungen mit Flüssigkeiten durchführen zu können, wurde eine eigens angefertigte Zellkautschukplatte mit darin eingelassenen 50 µl-Reagiergefäßen verwendet, mit der es möglich war, die Volumina sehr klein zu halten und die konkave Oberfläche auszunutzen und so störende Reflexionen weitestgehend zu vermeiden. Bei Untersuchungen *in vivo* muss in der Regel nicht mit derartigen Erscheinungen gerechnet werden.

Die Vorversuche zeigten zunächst, wie erwartet, einen Anstieg der Fluoreszenzintensität mit steigender DY-676-Konzentration (siehe 4.1.1). Je mehr Fluorochrom in einer Lösung enthalten war, desto höher war die Fluoreszenzintensität. Dieser Grundsatz scheint jedoch nicht unbegrenzt zu gelten, denn ab einer Konzentration von 25 µM war zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität niedriger war als bei geringer konzentrierten Lösungen. Der Grund

für dieses Phänomen, dass höher konzentrierte Farbstofflösungen schwächere Fluoreszenzsignale liefern als niedriger konzentrierte, liegt höchstwahrscheinlich im so genannten „Self-quenching“. Hohe Konzentrationen bedingen eine hohe Anzahl von Zusammenstößen zwischen den Molekülen, so dass bei jeder Kollision ein strahlungsloser Übergang entsteht. Dadurch verliert das betroffene Teilchen Energie in Form von Wärme an die Umgebung, folglich sinkt die Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes ab einem gewissen Grad in Abhängigkeit von dessen Konzentration (HOPT 2004). Dieses Phänomen wurde in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Farbstoffen beobachtet (GRUBER et al. 2000; ANDERSON, NERURKAR 2002)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensität bei konstanter DY-676-Konzentration von der Belichtungszeit abhängig ist (siehe 4.1.1). Eine ansteigende Belichtungszeit bedeutet eine größere Menge an exzitatorischer Energie, die in die Farbstofflösung eingebracht wird und resultiert demzufolge in einer erhöhten Fluoreszenz, da auch die Kamera entsprechend länger detektiert.

Das hier verwendete Detektionssystem kann die Fluoreszenzintensität jedoch nur bis zu einer bestimmten Grenze aufnehmen. Zeigte das Falschfarbenbild Farben im hellroten bis weißen Bereich (Abbildung 8), konnten möglicherweise falsche Schlüsse gezogen werden, da unter Umständen eine höhere Fluoreszenzintensität vorlag, als das Gerät anzeigen konnte. Ab einer bestimmten, von der Farbstoffkonzentration abhängigen Belichtungszeit war der Anstieg dann nicht mehr linear, sondern es trat eine Sättigung ein, die bei 4095 b. E. lag. Höhere Fluoreszenzintensitäten vermag das optische Bildgebungssystem nicht zu detektieren. In diesem Bereich sind demzufolge keine aussagekräftigen Ergebnisse zu erhalten. Wurde diese Tatsache für alle zukünftigen Versuche berücksichtigt, d.h. wurden Belichtungszeiten gewählt, die Fluoreszenzintensitäten lieferten, die eindeutig unterhalb der Detektionsgrenze, also der Sättigungsintensität von 4095 b. E. lagen, war eine Aussagekraft der Ergebnisse gegeben. Bei welcher Belichtungszeit genau jedoch die Sättigung eintrat, war wiederum abhängig von der Konzentration des Farbstoffes. Das beweist, dass es sich dabei tatsächlich um eine gerätetechnisch bedingte Detektionsgrenze handelt, denn wie oben beschrieben, führen höhere Konzentrationen DY-676 (zwischen 0,4 und 10  $\mu\text{M}$ ) zu höheren Fluoreszenzintensitäten, jedoch ist dies im Bereich der Detektionsgrenze nicht mehr gegeben, da das optische Bildgebungssystem keine höheren Intensitäten zu detektieren vermag.

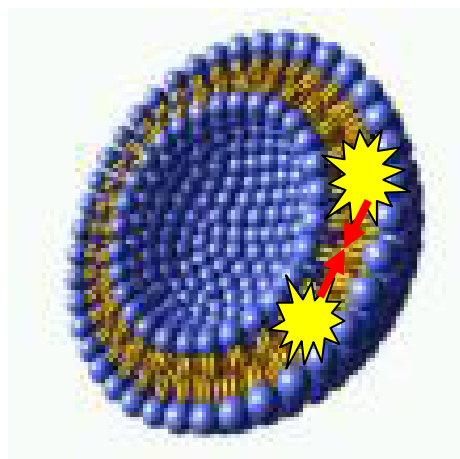
Bei Untersuchung des Einflusses der automatischen Korrektur und des Binningfaktors stellte sich heraus, dass die Verwendung der Korrektur keine wesentliche Auswirkung auf die

Fluoreszenzintensitäten hatte (siehe 4.1.1). Der Grund dafür liegt darin, dass bei den Experimenten darauf geachtet wurde, dass die Probe stets in dem in 3.1.3 aufgeführten homogen ausgeleuchteten Feld platziert wurde. Die Wahl von Binningfaktor 2 dagegen führte zu höheren Fluoreszenzintensitäten als Binningfaktor 1. Dies war zu erwarten, denn Binning bedeutet die Möglichkeit, Einzelpixel zu Pixelblöcken zusammenzufassen. Ein zweifach-Binning fasst zwei Pixel vertikal und zwei Pixel horizontal zu einem Einzelpixel zusammen, wodurch eine möglichst hohe Empfindlichkeit der Pixel erreicht wird. (PAECH 2001). Das hier erhaltene Ergebnis bestätigte diese Aussage. Andererseits resultiert aus der Zusammenfassung von Pixeln eine Verschlechterung der Auflösung, die jedoch für die Vor- oder *in vitro*-Versuche nicht von Bedeutung war, da in diesem Fall die Darstellung von Strukturen nicht relevant war.

Die Untersuchung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der DY-676- Konzentration in den Liposomen (0,06 bis 3 mol%), zeigte, dass mit zunehmender Farbstoffkonzentration in den Vesikeln die Fluoreszenzintensität anstieg (siehe 4.1.2). Die Liposomenformulierungen wurden für diesen Versuch verdünnt, so dass daraus DY-676- Konzentrationen in der Lösung von 0,06 bis 3  $\mu\text{M}$  resultierten, was zu einer Vergleichsmöglichkeit mit den Ergebnissen aus den Vorversuchen (siehe 4.1.1) führte.

Dieses Ergebnis aus den Versuchen mit reinem DY-676, das besagt, dass höhere Farbstoffkonzentrationen höhere Fluoreszenzintensitäten zur Folge haben, wurde in den Versuchen mit DY-676-haltigen Liposomen bestätigt. Der Vergleich mit den Ergebnissen der DY-676-Lösungen aus 4.1.1 zeigt, dass bei dem in Liposomen eingebauten DY-676 in einer Konzentration von 3mol%, was in der Verdünnung einer DY-676-Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  entsprach, die Fluoreszenzintensität unter der der 3  $\mu\text{M}$  DY-676-Lösung lag, und zwar um ca. 22% ( $1886,3 \pm 26,2$  vs.  $2407,0 \pm 76,6$  b. E.; Werte bei 1 s Belichtung mit BF 2). Auch die Eigenfluoreszenz der Liposomen, also Liposomen, die keinen Farbstoff enthalten, ist niedriger als die einer 0  $\mu\text{M}$  DY-676-Lösung, also von PBS. Möglicherweise absorbieren die Liposomen selbst, also die Lipide, einen Teil der eingestrahnten Lichtenergie, so dass nicht mehr die gesamte Energie zur Anregung der Farbstoffmoleküle und zur Erzeugung von Fluoreszenz zur Verfügung steht. Ein weiterer Grund könnte der bereits beschriebene „Self-quenching-Effekt“ sein, denn möglicherweise kommen sich die DY-676-Moleküle innerhalb der Lipiddoppelschicht zu nahe und es kommt so zu Zusammenstößen der Farbstoffmoleküle und in Folge dessen zur Auslöschung der Fluoreszenz (Abbildung 43). Dies wäre jedoch ein

Problem, das nur schlecht beeinflusst werden kann, da die nötige Menge an Farbstoffmolekülen in den Liposomen nur einen begrenzten Platz vorfindet und ihre Dichte innerhalb der Lipiddoppelschicht damit feststeht. Ob es tatsächlich Einflüsse der Lipide auf die Absorption von Licht gibt und wie diese genau stattfinden, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.



**Abbildung 43:**

Schematische Darstellung des möglichen “Self-quenching-Effekts” (rote Pfeile) von Farbstoffmolekülen (gelb) innerhalb einer Lipiddoppelschicht von Liposomen.

Auch die bereits diskutierte Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Belichtungszeit konnte in den Untersuchungen mit DY-676-markierten Liposomen beobachtet werden. Die gerätetechnisch bedingte Sättigungsintensität wurde lediglich von den Liposomenformulierungen mit 0,3 und 3 mol% erreicht. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde die Liposomenformulierung mit einem DY-Gehalt von 3 mol% für die weiteren Versuche ausgewählt, da diese im Bereich zwischen 0,1 und 3 Sekunden einen starken Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Belichtungszeit mit sich brachte und somit bei bereits kleinen Zunahmen der Belichtungszeit große Änderungen der Fluoreszenzintensität zur Folge hatte. Jedoch war auch hier zu erkennen, dass mit Belichtungszeiten von in diesem Fall über 3 Sekunden die bereits beschriebene gerätetechnisch bedingte Sättigung eintrat, und Ergebnisse mit diesen Belichtungszeiten nicht verwertbar waren. Es war also auch in den Experimenten mit Liposomen darauf zu achten, dass die Belichtungszeiten so gewählt wurden, dass Fluoreszenzintensitäten eindeutig unterhalb der Detektionsgrenze resultierten.

Es zeigt sich also, dass im Gegensatz zu reinen Farbstofflösungen bei liposomal gebundenem DY-676 mit zusätzlichen Einflüssen der Lipide auf die Fluoreszenz der Farbstoffmoleküle gerechnet werden muss und auch hier der Self-quenching-Effekt eine Rolle spielen kann.

In der Literatur lassen sich zu den Untersuchungen dieser Arbeit mit DY-676-markierten Liposomen kaum vergleichbare Werte finden, da grundsätzlich mit anderen Farbstoffen, oberflächenmodifizierten Liposomen oder anderen Nachweismethoden gearbeitet wurde (KIRPOTIN et al. 1997, MAMOT et al. 2003).

Aus den Stabilitätsuntersuchungen der Liposomen über einen Zeitraum von 2 Monaten mittels FACS ging hervor, dass eine Lagerung der Liposomen über 28 Tage bei 4°C im Dunkeln keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität hatte (siehe 4.1.3). Nach 56 Tagen jedoch war die Fluoreszenzintensität leicht abgeschwächt. Vermutlich kommt es zu einem Integritäts- und damit Farbstoffverlust der Vesikel. Um das genau beurteilen zu können, müssten jedoch die Partikel selbst untersucht werden, hier kann lediglich eine Aussage über die Fluoreszenz getroffen werden. Die gerätespezifischen Parameter des FACS-Gerätes waren für die Messungen im Untersuchungszeitraum stets identisch, so dass die Ergebnisse untereinander vergleichbar waren.

Untersuchungen von Röhrborn zur Stabilität von Liposomen wurden bei 37°C durchgeführt, da die Untersuchungen bei 4°C einen zeitlich vertretbaren Rahmen sprengen würden. Bei 4°C findet demnach eine sehr langsame Desintegration der Liposomen statt (RÖHRBORN 2004). Wie lange dieser Prozess jedoch genau dauert, wird nicht erwähnt, und somit ist eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen dieser Arbeit schwierig.

Durch Untersuchungen von Kirby et al., die die Stabilität bis 53 Tage nach Herstellung der Liposomen untersuchten, konnten keine Veränderung der Erscheinungsform oder der Integrität der Vesikel festgestellt werden. (KIRBY et al. 1980).

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine beginnende Veränderung der Stabilität im Hinblick auf die Fluoreszenzintensität nach 56 Tagen festgestellt. Ob es sich dabei tatsächlich um eine Desintegration oder nur um eine zufällige Abweichung handelt, müsste in weiteren Versuchen geklärt werden.

Bei korrekter Lagerung (4°C, Dunkelheit) ist dennoch von einer ausreichend langen Haltbarkeit der Liposomen auszugehen (RÖHRBORN 2004; KIRBY et al. 1980). Dies ist im Hinblick auf eine mögliche zukünftige klinische Anwendung ein großer Vorteil, da die Liposomen über einen langen Zeitraum rasch verfügbar sind und somit auch die Kosten und die Wartezeiten der ständigen Herstellung neuer Liposomen möglichst gering ausfallen.



Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in den Vorversuchen die optimalen Parameter für das Arbeiten mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI ermittelt werden konnten. Es stellte sich heraus, dass sich die Belichtungszeiten so gewählt werden müssen, dass die Detektionsgrenze des Gerätes nicht überschritten wird, also die resultierenden Fluoreszenzintensitäten nicht im Bereich der Nachweisgrenze liegen, um so aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Wann, also bei welcher Belichtungszeit die Nachweisgrenze erreicht wird, ist jedoch stets abhängig vom Untersuchungsobjekt. Der Einfluss der automatischen Korrektur ist dann zu beachten, wenn die Größe des Versuchsobjektes den homogen ausgeleuchteten Bereich überschreitet, der Binningfaktor ist dann von Bedeutung, wenn die Darstellung von anatomischen Strukturen eine wichtige Rolle spielt. Ebenso ist auf eine geeignete Farbstoffkonzentration zu achten, bei der es nicht zum Auftreten von quenching-Effekten kommt, was sowohl für reine Farbstofflösungen als auch für liposomal gebundenen Farbstoff gilt. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass Liposomen bei entsprechender Lagerung über einen Zeitraum von mindestens 28 Tagen stabil bleiben und entsprechend lange verwendet werden können, ohne eine Verfälschung der Ergebnisse zu provozieren.

## **5.2 *In vitro*-Zellversuche**

Da der Hauptteil der Versuche die bildgebende Darstellung eines Entzündungsprozesses zum Inhalt hatte und dies durch eine Markierung von Makrophagen erreicht werden sollte, wurden in den dafür im Vorfeld durchgeführten *in vitro*-Zellversuchen die optimalen Bedingungen zur Markierung von Makrophagen und deren Nachweis untersucht.

Es wurde unter anderem gezeigt, dass die Fluoreszenzintensität der mit Liposomen inkubierten Makrophagen abhängig von der Oberfläche der Liposomen war (siehe 4.2.1). Dabei war zunächst ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen Makrophagen, die mit DY-676-markierten Liposomen inkubiert worden waren und Makrophagen, die mit unmarkierten Liposomen inkubiert worden waren, zu erkennen. Die Grund-DY-Liposomen schienen besser aufgenommen zu werden als jene, die an ihrer Oberfläche Mal-PEG trugen.

Dies war zu erwarten, denn es ist bekannt, dass eine Pegylierung zu einer Hemmung der Aufnahme in Zellen des Retikuloendothelialen Systems (RES), zu denen Makrophagen gehören, führt (BLUME, CEVC 1990). Dieses wichtige Phänomen wird für gewöhnlich

sterischen Effekten des Doppelschicht-gebundenen Polymers zugeschrieben (MILLER et al. 1998). Durch die langsamere Elimination der Vesikel durch das RES verlängert sich ihre Bluthalbwertszeit und damit ihre Bioverfügbarkeit.

Der hemmende Einfluss der Pegylierung auf die Aufnahme der Zellen in die Makrophagen wurde auch in den *in vitro*-Zellversuchen der vorliegenden Arbeit festgestellt.

Bei der im Anschluss an die Untersuchung mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI durchgeführten FACS-Analyse sah man ebenfalls eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der Makrophagen von der Art der Oberfläche der Liposomen, mit denen diese inkubiert wurden. Somit konnte auch mit einer etablierten Methode das mit dem bonSAI gewonnene Ergebnis bestätigt werden.

Inwiefern die in der Lipiddoppelschicht eingebauten DY-676-Moleküle einen Einfluss auf die Oberflächenladung und somit die Aufnahme in Makrophagen haben, wurde nicht untersucht. Da das Zeta-Potential nicht bestimmt wurde, können keine Aussagen darüber getroffen werden, ob es Unterschiede in der Wechselwirkung zwischen Zellen und Liposomen mit und ohne DY-676 gibt.

Bei den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Makrophagenkonzentration wurde gefunden, dass Zellzahlen zwischen  $0,1$  und  $5 \times 10^6$  Zellen in einem Gesamtvolumen von  $35 \mu\text{l}$  einen Anstieg der Fluoreszenzintensität zur Folge hatte (siehe 4.2.4). Dies war zu erwarten, da eine größere Anzahl von Makrophagen auch insgesamt mehr Farbstoff internalisiert haben, was folglich in einer erhöhten Fluoreszenzintensität resultiert. Anhand der Ergebnisse der FACS-Analysen (siehe Abbildung 24) lässt sich dieser Sachverhalt einfach erklären. Darin ist zu erkennen, dass nach achtstündiger Inkubationszeit nahezu alle Zellen mit Liposomen markiert waren und eine homogene Verteilung dieser Zellen vorlag. Betrachtet man die einzelnen Zellzahlen, so lässt sich sagen, dass diese Beobachtung für jede Zellzahl anzuwenden ist. Wenn also zwischen  $0,1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  Zellen jeweils ca. 99% der Makrophagen mit Liposomen markiert wurden, dann ergibt sich daraus in der Addition ein Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zellzahl.

Weiter war zu erkennen, dass eine Mindestzellkonzentration von  $0,1 \times 10^6$  Zellen pro  $35 \mu\text{l}$  Gesamtvolumen nötig war, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Es muss also eine bestimmte Anzahl an Makrophagen vorhanden sein, damit ein Nachweis derselben möglich ist. Diese Tatsache spielt eine Rolle im Hinblick auf die Übertragung dieses

Ergebnisses auf die *in vivo*-Situation. Denn auch dort muss eine Mindestkonzentration von Makrophagen vor Ort sein, um einen Nachweis dieser Zellen zu ermöglichen.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Inkubationszeit von 2 bis 72 Stunden die Fluoreszenzintensität anstieg (siehe 4.2.3). Bereits nach zweistündiger Inkubationszeit wurden Fluoreszenzintensitäten gemessen, die sich signifikant von denen unbehandelter Zellen unterschieden. Das deutet darauf hin, dass die Makrophagen die Liposomen rasch internalisieren, was nach Angaben in der Literatur auch tatsächlich der Fall ist (ALBERTS 1995).

Zudem gilt, dass je länger die Makrophagen Zeit haben, desto mehr Liposomen sie aufnehmen können, zumindest konnte dies bis 72 Stunden verfolgt werden. Es tritt keine Sättigung bis zu diesem Zeitpunkt ein. Auch die im Anschluss durchgeführte FACS-Analyse bestätigte das mit dem optischen Bildgebungssystem bonSAI gewonnene Ergebnis, dass bis 72 Stunden Inkubationszeit ein Anstieg der Fluoreszenzintensität festzustellen ist. Bestätigungen dieser Messungen finden sich auch in der Literatur. Nishikawa et al. stellten ebenfalls eine Zeitabhängigkeit in der Aufnahme von Phospholipid-Cholesterol-Vesikeln durch Makrophagen fest, diese Abhängigkeit wurde bis 36 Stunden verfolgt und über die Messung der Radioaktivität ermittelt (NISHIKAWA et al. 1990). Vermutlich wird der Farbstoff im schwach sauren Milieu innerhalb der Liposomen (ALBERTS 1995) nur in sehr geringem Maße abgebaut und akkumuliert dort. Was nach 72 Stunden im Hinblick auf die Fluoreszenzintensität bzw. Metabolisierung des Farbstoffes passiert, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Es zeigte sich also, dass Makrophagen Lipidvesikel rasch internalisieren und damit aufgenommene Substanzen, im Falle der vorliegenden Arbeit Fluorochrome, nur langsam metabolisieren.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass mit ansteigender Liposomenkonzentration zur Inkubation der Makrophagen die Fluoreszenzintensität anstieg (siehe 4.2.5). Dies war nach den Ergebnissen der Vorversuche zu erwarten.

Bereits Lipidkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , was einer DY-676-Konzentration von 31 nM entspricht, führten zu Fluoreszenzintensitäten, die signifikant höher waren als die Eigenfluoreszenz der Zellen. Der weitere Anstieg der Signalintensität mit Zunahme der zugegebenen Liposomenmenge deutet darauf hin, dass wenn den Makrophagen mehr Liposomen zur Verfügung stehen, eine verstärkte Aufnahme erfolgen kann. Dies steht in

Übereinstimmung mit Ergebnissen von Metz et al., die ähnliche Experimente mit Nanopartikeln durchgeführt hatten (METZ et al. 2004). Die genaueren Mechanismen zur Phagozytose von fluorochrommarkierten Liposomen durch Makrophagen müssten jedoch durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Mit den hier getesteten Konzentrationen tritt noch keine Sättigung der Zellen ein, sondern die Makrophagen scheinen bis zur höchsten getesteten Konzentration die gesamten zur Verfügung stehenden Liposomen aufzunehmen. Dies geschieht über einen Zeitraum von 16 Stunden. Da in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, dass bereits nach zweistündiger Inkubation signifikante Signalintensitäten gemessen wurden, muss angenommen werden, dass auch in den Untersuchungen zur Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Liposomenkonzentration schon nach zwei Stunden eine Aufnahme von Vesikeln erfolgte und bis 16 Stunden weiter Liposomen phagozytiert wurden, bis vermutlich schließlich alle im Medium vorhandenen Liposomen internalisiert waren. Das Nichterreichen einer Sättigungskonzentration bei 16 Stunden Inkubationszeit lässt darauf schließen, dass der Farbstoff demnach tatsächlich sehr lange nicht metabolisiert wird, sondern in der Zelle akkumuliert.

In den *in vitro*-Zellversuchen gelang es somit, Makrophagen mit Grund-DY-Liposomen zu markieren. Dabei spielte die Oberfläche der Liposomen eine Rolle für die Aufnahme in die Zellen, konventionelle Liposomen wurden besser aufgenommen als pegylierte Vesikel. Ein Anstieg der Zellzahl bedeutete vermehrten internalisierten Farbstoff und damit höhere Fluoreszenzintensitäten. Ebenso führte eine Verlängerung der Inkubationszeit zu höheren Signalintensitäten, was darauf hindeutet, dass der Farbstoff in den Zellen akkumuliert und nur sehr langsam metabolisiert wird. Bei ansteigender Liposomenkonzentration konnte gezeigt werden, dass eine höhere Verfügbarkeit an Liposomen zu einer verstärkten Aufnahme in die Zellen führt.

### **5.3 *In vivo*-Versuche**

Anhand der *in vivo*-Untersuchungen am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein Entzündungsprozess mit Hilfe fluorochrommarkierter Liposomen mit dem optischen Kleintierscanner bonSAI nachweisbar ist.

Bei den Untersuchungen einer Peritonitis zeigte sich, dass die Applikation des Kontrastmittels zu einer deutlichen Fluoreszenz im entzündeten Abdomen führte, während die Kontrollen deutlich schwächere Signale lieferten. Auffallend war jedoch die Verteilung der Fluoreszenz über das gesamte Abdomen und nach Untersuchung der Organe ein starkes Signal in der Leber. Das erhaltene Signal bei Tieren, die sowohl eine Peritonitis aufwiesen, als auch das Kontrastmittel bekamen, war also nicht eindeutig ein Signal, das durch die Peritonitis hervorgerufen wurde, da ebenfalls eine erhebliche Akkumulation der Liposomen in der Leber vorlag, außerdem führt das nicht vermeidbare Auftreten von Reflexion und Streuung im Gewebe zu einer zusätzlichen Erschwerung der Differenzierung.

Die starke Akkumulation der Vesikel in der Leber ist damit zu begründen, dass konventionelle Liposomen rasch von Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) eliminiert werden (ALLEN, CHONN 1987; LASIC et al. 1991).

Auch bei Applikation der pegylierten Liposomen fiel ein über das gesamte Abdomen sich erstreckendes Fluoreszenzsignal auf, wobei das Lebersignal in diesem Fall leicht abgeschwächt war, aber nicht ausreichend stark reduziert werden konnte, um eine eindeutige Differenzierung zwischen Peritonitis und Leber vorzunehmen. Ein Grund dafür liegt möglicherweise darin, dass die Pegylierung eine Verschlechterung der Aufnahme von Liposomen in Zellen des RES bedingt, zu denen Makrophagen gehören. Also nehmen nicht nur Zellen des RES, also u. a. der Leber, die Liposomen schlechter auf, sondern auch die Makrophagen, die im Rahmen der Entzündung eingewandert sind. Dass Makrophagen pegylierte Vesikel weniger gut phagozytieren, wurde bereits in den *in vitro*-Untersuchungen gezeigt und ist in der Literatur belegt (BLUME, CEVC 1990). Dies hat nun möglicherweise zur Folge, dass sowohl innerhalb des Entzündungsherdes als auch des RES eine annähernd gleichermaßen ausgeprägte Verminderung der Aufnahme der Vesikel resultiert, so dass das Ergebnis im Vergleich zu dem Ergebnis mit konventionellen Liposomen verhältnismäßig gleich bleibt, also keine Unterscheidung zwischen Peritonitis- und Lebersignal auszumachen ist.

Was der zeitliche Ablauf des Fluoreszenzsignals im Bereich des Abdomens anbelangt, so war bei beiden Liposomenformulierungen eine Steigerung des Fluoreszenzsignals bis 48 Stunden zu beobachten. Es verstärkte sich sowohl das Lebersignal als auch das Signal im Bereich des Darmes. Die Makrophagen scheinen sich nur langsam im Peritoneum anzusammeln, worauf durch Untersuchungen von Ajuebor et al. hingewiesen wird. Demnach folgen einer initialen

Verringerung der Makrophagenzellzahl im Peritoneum durch Abwanderung und Anheftung der Zellen in bzw. an die innere Schleimhaut (bis 2 Stunden nach Zymosan-Gabe) ein erneute Einwanderung im Peritoneum und ein daran anschließender Anstieg der Zellzahl zwischen 6 und 24 Stunden. Nach 48 Stunden liegen erniedrigte Werte vor (AJUEBOR et al. 1998). Schüler konnte in Experimenten zur Bildgebung einer Peritonitis mit einer DY-676-Lösung einen Anstieg der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit bis 2 Stunden nach Applikation des Kontrastmittels und Zymosans feststellen, der von einem Abfall der Signalintensität bis 6 Stunden nach Versuchsbeginn gefolgt wurde (SCHÜLER 2006). Der Grund für die rasche Metabolisierung der Farbstofflösungen im Vergleich zu den in dieser Arbeit verwendeten DY-676-markierten Liposomen liegt darin, dass es sich bei dem „freien“ Farbstoff um ein um ein Vielfaches kleineres Molekül handelt als bei den Liposomen. Dieses wird vergleichsweise rasch renal eliminiert (SCHÜLER 2006).

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der isolierten Peritonealmakrophagen zeigten, dass die Zellen die Liposomen aufgenommen hatten und diese bzw. der Farbstoff in Form von Kompartimenten, wahrscheinlich in Lysosomen, angereichert waren. Inwieweit eine vermehrte Durchblutung am Entzündungsort zu einer verstärkten Anflutung des Kontrastmittels in der erkrankten Region geführt hat und somit ein Fluoreszenzsignal bedingte, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Ein spezifischer Nachweis einer Peritonitis war mit den Liposomen aufgrund des starken Lebersignals nicht möglich. Da auch pegylierte Liposomen keine wesentliche Änderung der Liposomenaufnahme in die Leber zur Folge hatten, konnte nur noch eine räumlich Distanz zwischen Entzündungsherd und Leber zu einem eindeutigen, für die Entzündung spezifischen, Signal führen.

Das zweite Modell für eine Entzündung, und zwar das eines Ödems des äußeren Ohres, erfüllte diese Voraussetzung.

Bei den dazu durchgeführten Untersuchungen war ein deutliches Fluoreszenzsignal im Bereich des Ohrödems zu erkennen, wohingegen die Kontrollen ein schwächeres Signal lieferten. Das spricht für einen spezifischen Nachweis des Ohrödems, und dafür, dass die Liposomen tatsächlich ihren Bestimmungsort erreichen.

Dies war zu erwarten, denn mit der Entzündung liegt ein Zustand vor, der die unter physiologischen Bedingungen vorliegende Kompartimentsbeschränkung der Liposomen, d. h. die Beschränkung der Vesikel auf das Blutssystem, in welches sie appliziert wurden, aufhebt,

und der dazu führt, dass die Liposomen die vaskulären Endothelzellen und die Basalmembran durchdringen und somit ein extravasales Target erreichen können (ROSENECKER et al. 1996). Auch hier könnte eine vermehrte Perfusion der Entzündungsregion, wie sie gerade in der ersten Phase der Entzündung zu finden ist, und damit ein verstärktes Anfluten des Kontrastmittels eine Rolle für das auftretende Fluoreszenzsignal spielen, dies wurde jedoch nicht untersucht.

Die CLSM-Aufnahmen der isolierten Makrophagen zeigten, dass diese die Liposomen internalisiert hatten. Wo genau die Markierung der Makrophagen mit den Liposomen stattfindet, ob im Blutgefäßsystem oder erst am Entzündungsort, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. In der Literatur findet man Hinweise darauf, dass die Phagozytose die Hauptaufgabe von eingewanderten Entzündungszellen ist (KRAUSE 2000), was darauf schließen lässt, dass die Markierung erst am Ort des Geschehens stattfindet. Auch Rosenecker et al. berichten, dass zunächst eine Extravasation der Liposomen ins Gewebe stattfindet, gefolgt von einer Aufnahme in Zellen, u. a. in Makrophagen (ROSENECKER et al. 1996).

Was die Untersuchung der Organe der Tiere beim Ohrödem-Modell betrifft, so wiesen alle entnommenen Organe (Milz, Niere, Leber) der Tiere, die kein Kontrastmittel bekamen, eine vergleichbare Fluoreszenzintensität auf. Die Tiere, denen die Liposomen appliziert wurden, zeigten demgegenüber eine erhöhte Signalintensität in Milz und Leber, die Niere zeigte keinen wesentlichen Unterschied zur Kontrolle.

Die Fluoreszenzintensitäten in Leber und Milz wurden dabei durch die bereits beschriebene rasche Aufnahme der Liposomen in die Zellen des RES verursacht. Dies war nach den Ergebnissen der Untersuchungen mit dem Peritonitis-Modell zu erwarten. Im Falle des Ohrödems spielt das Lebersignal allerdings keine Rolle, da ein ausreichender räumlicher Abstand zwischen Entzündung und Leber besteht.

Das fehlende Signal in der Niere deutet darauf hin, dass eine renale Metabolisierung des liposomalen Kontrastmittels nicht zu erwarten ist. Darauf finden sich auch Hinweise in der Literatur (ABRAHAM, WALUBO 2005; MUKUNDAN et al. 2006)

Ein Entzündungsprozess im Bereich des äußeren Ohres lässt sich also gut mit Hilfe des liposomalen DY-676-haltigen Kontrastmittels darstellen.

Die Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität im Bereich des Ohrödems zeigte zwischen 2 und 48 Stunden Inkubationszeit deutliche Fluoreszenzen bei den Tieren, die sowohl mit Zymosan als auch mit dem Kontrastmittel behandelt wurden. Ab einer Inkubationszeit von 2 Stunden war ein spezifisches Signal nachweisbar. Bereits in den *in vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen die Liposomen rasch aufnehmen. In der *in vivo*-Situation muss jedoch zunächst das Kontrastmittel über den Blutstrom angeflutet werden und anschließend ins Gewebe übertreten. Dort finden sich dann aber, wie die *in vitro*-Situation bereits zeigte, Makrophagen, die bereit sind, die Vesikel schnell zu internalisieren.

Das Fluoreszenzsignal im Bereich des Ohrödems war nach 4 Stunden am deutlichsten ausgeprägt. Untersuchungen von Kurnatowska und Pawlikowski stellen den Höhepunkt des Ohrödems durch Wiegen des ödematösen Ohres nach 4,5 Stunden fest (KURNATOWSKA, PAWLIKOWSKI 2001). Zu diesem Zeitpunkt ist die Entzündung, und damit auch die Makrophagenkonzentration, am stärksten bzw. höchsten. Wie bereits dargestellt, hat eine höhere Anzahl an phagozytierenden Zellen eine höhere Menge an internalisiertem Kontrastmittel zur Folge, wodurch sich das erhöhte Fluoreszenzsignal zu diesem Zeitpunkt erklären lässt.

In den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Untersuchungen wurden oberflächennahe Entzündungsprozesse dargestellt. Der Nachweis tieferliegender Entzündungen mit dieser Art der Bildgebung, d. h. der Nah-Infrarot-Fluoreszenzbildgebung, wird limitiert durch die Gewebepenetration des Lichtes. Zwar vermag Licht dieses Wellenlängenbereiches einige Zentimeter tief ins Gewebe einzudringen, aufgrund der Lichteigenschaften wie Absorption und Streuung durch das Gewebe ist die Detektionsgrenze jedoch auf einige Millimeter bis Zentimeter limitiert. Dadurch können nur vergleichsweise oberflächlich liegende Entzündungsherde sicher diagnostiziert werden.

Außerdem lässt sich feststellen, dass eine Entzündungsdarstellung *in vivo* mit einem fluorochrommarkierten liposomalen Kontrastmittel und dem neuartigen optischen Bildgebungssystem bonSAI grundsätzlich möglich ist. Es ist jedoch zu beachten, dass eine starke Interaktion zwischen Liposomen und Zellen des RES besteht, die bei Entzündungen in Lebernähe zu störenden Signalen führt. Aus diesem Grund kann ein liposomales Kontrastmittel in der Form, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, vor allem



zum Nachweis von entzündlichen Prozessen in ausreichend großem Abstand von der Leber eingesetzt werden.

Liposomen können aber nicht nur im Bereich der Diagnostik große Dienste leisten, sondern sie können auch für die Therapie genutzt werden, denn ein entscheidender Vorteil von Liposomen ist die Möglichkeit, Medikamente darin zu verkapseln. Diese Hülle um das Medikament bewirkt eine längere Wirkdauer. Es bietet sich auch eine Funktionalisierung der Liposomen an, also eine Verankerung von gegen spezifische zelluläre Oberflächenmoleküle gerichteten Antikörpern an der Vesikeloberfläche, so dass die Liposomen und damit der Wirkstoff nur am gewünschten Ort angeflutet werden. Dadurch könnten in Zukunft Liposomen z.B. für die Therapie der Rheumatoiden Arthritis eingesetzt werden. Bei gleichzeitigem Einbau eines signalgebenden Elementes, wie z. B. eines Fluorochroms, könnten die so gewonnenen bimodalen Liposomen zusätzlich ein Monitoring der Therapie ermöglichen.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

**Abraham AM**, Walubo A. 2005. The effect of surface charge on the disposition of liposome-encapsulated gentamicin to the rat liver, brain, lungs and kidneys after intraperitoneal administration. *Int J Antimicrob Agents*. May; 25(5):392-7.

**Ajuebor MN**, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, Perretti M. 1998. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol*. Jan; 63(1):108-16.

**Alberts, B.** 1995. *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage. Weinheim: VCH, 729-739.

**Allen TM**, Chonn A. 1987 Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett*. Oct 19; 223(1):42-6.

**Anderson GP**, Nerurkar NL. 2002. Improved fluoroimmunoassays using the dye Alexa Fluor 647 with the RAPTOR, a fiber optic biosensor , *J Immunol Methods*. 20;271(1-2):17-24.

**Andreopoulos D**, Kasi LP, Kim E, Diaz M, Yang DJ, Asimacopoulos PJ. 2002. Detection of acute postoperative mediastinitis in mice using <sup>99m</sup>Tc-liposomes. *Invest Radiol*. Aug; 37(8):435-9.

**Anonymus.** 2005. Bei Atherosklerose muß Entzündung gebremst werden. <http://www.aerztezeitung.de/docs/2005/08/30/152a1102.asp?cat=/medizin/diabetes>. Artikel vom 30.08.2005. Eingesehen am 02.09.2005.

**Anonymus.** 2005. <http://www.ciw.uni-karlsruhe.de/..liposome.html>. Eingesehen am 07.05.2005.

**Awasthi VD**, Goins B, Klipper R, Phillips WT. 2002. Accumulation of PEG-liposomes in the inflamed colon of rats: potential for therapeutic and diagnostic targeting of inflammatory bowel diseases. *J Drug Target*. Aug; 10(5):419-27.

**Blume G**, Cevc G. 1990. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim Biophys Acta*. Nov 2; 1029(1):91-7.

**Bremer C**, Ntziachristos V, Mahmood U, Tung CH, Weissleder R. 2001. Fortschritte in der optischen Bildgebung. *Radiologe*. 41:131-37.

**Brostrom O**, Lofberg R, Nordenvall B, Ost A, Hellers G. 1987. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. An epidemiologic study. *Scand J Gastroenterol*. Dec; 22(10):1193-9.

**Cutler M**. 1929. Transillumination as an aid in the diagnosis of breast lesions. *Surg Gynecol Obstet*. 48:721-28.

**De Almeida CJG**, Chiarini LB, da Silva JP, e Silva PMR, Martins MA, Linden R. 2005. The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response. *J Leukoc Biol*. Feb; 77(2):238-46. Epub 2004 Nov 11.

**Drexler B**, Davis JL, Schofield G. 1985. Diaphanography in the diagnosis of breast cancer. *Radiology* Oct; 157(1):41-4.

**DYOMICS** Catalogue. 4<sup>th</sup> edition, Herbst 2005.

**Ekbom A**, Helmick C, Zack M, Adami HO. 1990. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 323:1229-33.

**Flower RW**, Hochheimer BF. 1976. Indocyanine green dye fluorescence and infrared absorption choroidal angiography performed simultaneously with fluorescein angiography. John Hopkins Med J. 138:33-42.

**Geslien GE**, Fisher JR, DeLaney C. 1985. Transillumination in breast cancer detection: screening failures and potential. AJR Am J Roentgenol. Mar; 144(3):619-22.

**Gisvold JJ**, Brown LR, Swee RG, Raygor DJ, Dickerson N, Ranfranz MK. 1986. Comparison of mammography and transillumination light scanning in the detection of breast lesions. AJR Am J Roentgenol. Jul; 147(1):191-4.

**Göhlert, A.** 2002. Multiphotonen Multicolor Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.

**Goulet JL**, Byrum RS, Key ML, Nguyen M, Wagoner VA, Koller BH. 2000. Genetic factors determine the contribution of leukotriens to acute inflammatory responses. J Immunol. May 1; 164(9):4899-907.

**Gruber HJ**, Hahn CD, Kada G, Riener CK, Harms GS, Ahrer W, Dax TG, Knaus HG. 2000. Anomalous fluorescence enhancement of Cy3 and cy3.5 versus anomalous fluorescence loss of Cy5 and Cy7 upon covalent linking to IgG and noncovalent binding to avidin., Bioconjug Chem. 11(5):696-704.

**Hackenbroch V.** 2004. Weltformel des Stoffwechsels. Der Spiegel. 46:182-186.

**Hengerer A**, Mertelmeier T. 2001. Molekularbiologische Methoden in der medizinischen Bildgebung. electromedica 69; Heft 1, 44-49.

**Herder C**, Illig T, Rathmann W, Martin S, Haastert B, Müller-Scholze S, Holle R, Thorand B, Koenig W, Wichmann HE, Kolb H. 2005. Inflammation and Type 2 Diabetes: Results from KORA Augsburg. *Gesundheitswesen*; 67 Sonderheft 1:S115-S121.

**Hilger I**, Leistner Y, Berndt A, Fritsche C, Haas KM, Kosmehl H, Kaiser WA. 2004. Near-infrared fluorescence imaging of HER-2 protein over-expression in tumor cells. *Eur Radiol.* Jun; 14(6):1124-9. Epub 2004 Apr 30.

**Högemann D**, Basilion JP, Weissleder R. 2001. Molekulare Bildgebung in der Magnetresonanztomographie und der Nuklearmedizin. *Radiologe.* 41:116-120.

**Hopt A**. 2004. Biophysikalische Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des Prionoproteins als Metalloprotein. Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München.

**Kewenter J**, Ahlmann H, Hulten L. 1978. Cancer risk in extensive ulcerative colitis. *Ann Surg.* Dec; 188(6):824-8.

**Kirby C**, Clarke J, Gregoriadis G. 1980. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. *Biochem J.* Feb 15; 186(2):591-8.

**Kirpotin D**, Park JW, Hong K, Zalipsky S, Li WL, Carter P, Benz CC, Papahadjopoulos D. 1997. Sterically Stabilized anti-HER2 Immunoliposomes: Design and Targeting to Human Breast Cancer Cells *in Vitro*. *Biochemistry.* Jan 7; 36(1):66-75.

**Koenig W**, Hoffmeister A, Khuseyinova N, Imhof A. 2003. Atherosklerose als inflammatorischer Prozess. *Deutsches Ärzteblatt* 100, Nr. 3 A117-A126.

**Krause A**. 2000. Herstellung und Charakterisierung E-Selektin-gerichteter Immunoliposomen zur Anwendung im Rahmen einer neuartigen antiinflammatorischen Therapie. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

**Kurnatowska I**, Pawlikowski M. 2001. Anti-inflammatory effects of somatostatin analogs on zymosan-induced earlobe inflammation in mice: comparison with dexamethasone and ketoprofen. *Neuroimmunomodulation*. 9(3):119-24.

**Lashner BA**, Silverstein MD, Hanauer SB. 1989. Hazard rates for dysplasia and cancer in ulcerative colitis. Results from a surveillance program. *Dig Dis Sci*. Oct; 34(10):1536-41.

**Lasic DD**, Martin FJ, Gabizon A, Huang SK, Papahadjopoulos D. 1991. Sterically stabilized liposomes: a hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times. *Biochim Biophys Acta*. Nov 18; 1070(1):187-92.

**Lautenschläger H**. 2003. Starke Wirkung – Phospholipide in Kosmetika. *Kosmetik International* (2), 38-40.

**Lautenschläger H**. 2003. Wirkstoffe: Liposomen, Nanopartikel & Co. *Beauty Forum* (5), 84-86.

**Leevy CM**, Smith F, Longueville J, Paumgartner G, Howard MM. 1967. Indocyanine green clearance as a test for hepatic function. Evaluation by dichromatic ear densitometry. *Jama*. 200:236-40.

**Licha K**, Riefke B, Ntziachristos V, Becker A, Chance B, Semmler W. 2000. Hydrophilic cyanine dyes as contrast agents for near-infrared tumor imaging: synthesis, photophysical properties and spectroscopic in vivo characterization. *Photochem Photobiol. Sep*; 71(3):392-8.

**Linkenheld, C.** 2002. Grundlagen der Fluoreszenzentstehung. <http://www.mikroskopie.de/kurse/fluoreszenz/elektron.html>. Erstellt am 13.03.2002. Eingesehen am 20.12.05.

**Mamot C**, Drummond DC, Greiser U, Hong K, Kirpotin DB, Marks JD, Park JW. 2003. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-targeted Immunoliposomes Mediate Specific and Efficient Drug Delivery to EGFR- and EGFRvIII-overexpressing Tumor Cells. *Cancer Res.* Jun 15; 63(12):3154-61.

**Metz S**, Bonaterra G, Rudelius M, Settles M, Rummeny EJ, Daldrup-Link HE. 2004. Capacity of human monocytes to phagocytose approved iron oxide MR contrast agents in vitro. *Eur Radiol.* Oct; 14(10):1851-8. Epub 2004 Jul 13.

**Miller CR**, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF. 1998. Liposome-Cell Interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry.* Sep 15; 37(37):12875-83.

**Monsees B**, Destouet JM, Gersell D. 1987. Light scan evaluation of nonpalpable breast lesions. *Radiology.* May; 163(2):467-70. Erratum in: *Radiology.* Oct; 165(1):292.

**Monsees B**, Destouet JM, Totty WG. 1987. Light scanning versus mammography in breast cancer detection. *Radiology.* May; 163(2):463-65.

**Müller S**, Martin S, Koenig W, Hanifi-Moghaddam P, Rathmann W, Haastert B, Giani G, Illig T, Thorand B, Kolb H. 2002. Impaired glucose tolerance is associated with increased serum concentrations of interleukin 6 and coregulated acute-phase proteins but not TNF-alpha or its receptors. *Diabetologia.* 45(6):805-12. Epub 2002 May 8.

**Mukundan S Jr**, Ghaghada KB, Badea CT, Kao CY, Hedlund LW, Provenzala JM, Johnson GA, Chen E, Bellamkonda RV, Annapragada A. 2006. A liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice. *AJR Am J Roentgenol.* Feb; 186(2):300-7.

**Nishikawa K**, Hiroyuki A, Inoue K. 1990. Scavenger Receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* Mar 25; 265(9):5226-31.

**Ntziachristos V**, Yodh AG, Schnall M, Chance B. 2000. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 14; 97(6):2767-72.

**Ntziachristos V**, Ripoll J, Wang LV, Weissleder R. 2005. Looking and listening to light: the evolution of whole-body photonic imaging. *Nat Biotechnol.* Mar; 23(3):313-20. Review.

**Paech W.** 2001. Baader Planetarium. <http://www.sbig.de/universitaet/glossar-hm/binning.htm>. Stand 11/2001. Eingesehen am 25.10.05.

**Park JW**, Hong K, Carter P, Asgari H, Guo LY, Keller GA, Wirth C, Shalaby R, Kotts C, Wood WI, Papahadjopoulos D, Benz CC. 1995. Development of anti-p185<sup>HER2</sup> immunoliposomes for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:1327-31.

**Pickup JC**, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. 1997. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* 40:1286-1292.

**Pickup JC**, Crook MA. 1998. Is Type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia.* 41:1241-1248.

**Prior P**, Gyde SN, Macartney JC, Thomson H, Waterhouse JA, Allan RN. 1982. Cancer morbidity in ulcerative colitis. *Gut.* Jun; 23(6):490-7.

**Pschyrembel** Klinisches Wörterbuch. 1997. 258. Auflage. Verlag Walter de Gruyter.



**Punchard NA**, Whelan CJ, Adcock I. 2004. The Journal of Inflammation. Journal of Inflammation. 1:1.

**Ralph P**, Nakoinz I. 1975. Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumor and its cloned cell line. Nature. Oct 2; 257(5525):393-4.

**Ralph P**, Nakoinz I. 1977. Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines: enhancement by PPD and LPS. J Immunol. Sep; 119(3):950-54.

**Riefke B**, Licha K, Semmler W. 1997. Contrast media for optical mammography. Radiologe. Sep; 37(9):749-55. Review.

**Röhrborn A**. 2004. Entwicklung, Charakterisierung und tierexperimentelle Anwendung einer liposomal verkapselten Form von Amikacin zur topischen Antibiotikatherapie. Habilitationsschrift. Heinrich Heine Universität Düsseldorf.

**Rosenecker J**, Zhang W, Hong K, Lausier J, Geppetti P, Yoshihara S, Papahadjopoulos D, Nadel JA. 1996. Increased liposome extravasation in selected tissues: Effect of substance P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Jul; 93(14):7236-41.

**Sanderson JB**. 1871. A system of Surgery, 2<sup>nd</sup> edition. London Longmans: Green and Co.

**Schad H**, Brechtelsbauer H, Kramer K. 1977. Studies on the suitability of a cyanine dye (Viher-test9 for indicator dilution technique and its application to the measurement of pulmonary artery and aortic flow. Pflugers Arch. 370:139-44.

**Schüler E**. 2006. Molekulare Nah-Infrarot-Bildgebung eines entzündlichen Prozesses mit Hilfe Fluorochrom-markierter Makrophagen. Dissertation. Friedrich-Schiller-Universität Jena.

**Seril DN**, Liao J, Yang GY, Yang CS. 2003. oxidative stress and ulcerative colitis-associated carcinogenesis: studies in humans and animal models. *Carcinogenesis*. Mar; 24(3):353-62. Review.

**Siebert A**. Introduction to bonSAI™. Siemens medical solutions that help.

**Spector WG**, Willoughby DA. 1963. The Inflammatory Response. *Bacteriological Reviews*. 27:117-149.

**Sugita A**, Sachar DB, Bodian C, Ribeiro MB, Aufses AH Jr, Greenstein AJ. 1991. Colorectal cancer in ulcerative colitis. Influence of anatomical extent and age at onset on colitis-cancer interval. *Gut*. Feb; 32(2):167-9.

**Volman THJ**, Goris RJA, van der Meer JWM, Hendriks T. 2004. Tissue- and time-dependent upregulation of cytokine mRNA in a murine model for the multiple organ dysfunction syndrome. *Ann Surg*. Jul; 240(1):142-50.

**Waxman AD**. 2002. PET: Funktionelle Bildgebung in der Onkologie. *Medicamundi*. Ausgabe 4. Oktober.

**Weissleder R**, Mahmood U. 2001. Molecular imaging. *Radiology*. May; 219(2):316-33. Review.

**Zeisig R**, Shimada K, Hirota S, Arndt D. 1996. Effect of sterical stabilization on macrophage uptake in vitro and on thickness of the fixed aqueous layer of liposomes made from alkylphosphocholines. *Biochim Biophys Acta*. Dec 4; 1285(2):237-45.

**Zhao L**, Moos MP, Grabner R, Pedrono F, Fan J, Kaiser B, John N, Schmidt S, Spanbroek R, Lötzer K, Huan L, Cui J, Rader DJ, Evans JF, Habenicht AJ, Funk CD. 2004. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. Nat Med. Sep; 10(9):966-73. Epub 2004 Aug 22.

## Anhang

### Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danke ich:

- Dem Institutsdirektor Prof. Dr. med. Dipl.-Chem. Werner A. Kaiser für die herzliche Aufnahme im Institut
- PD Dr. rer. nat. I. Hilger für die Bereitstellung des Themas, die zuverlässige konstruktive und fachkompetente Betreuung
- Dr. rer. nat. M.-R. Lisy für seine wertvollen Denkanstöße, sein motivierendes Lob sowie seine Geduld und moralische Unterstützung
- Frau Yvonne Heyne und Frau Brigitte Maron für die Einführung in die Arbeitstechniken der Zellkultur und für ihre hilfsbereite Unterstützung
- Fa. DYOMICS, Jena, für die Bereitstellung des Fluorochroms DY-676
- Herrn Apotheker Ronny Rüger (Institut für Pharmazeutische Technologie) für die Herstellung der Liposomen und sein geduldiges Beantworten meiner vielen Fragen
- Dr. rer. nat. M. Förster (AG Pneumologie) für die freundliche Bereitstellung des FACS
- Prof. Dr. med. A. Habenicht (Institut für Vaskuläre Medizin) für die Bereitstellung des CLSM
- Dr. Harald Schubert und Mitarbeitern (Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena) für die gute Zusammenarbeit
- Meinen fantastischen Mitdoktoranden in der Arbeitsgruppe, allen voran Tiemo Schramm, in dem ich einen guten Freund gefunden habe
- Meinen Eltern Theresia und Gerhard Deißler für ihren Glauben an mich und nicht zuletzt auch für die finanzielle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit
- Meinem lieben Freund Andreas Nader für seinen Zuspruch und seine unglaubliche Geduld mit mir

## Lebenslauf

**Name:** Deißler  
**Vorname:** Verena  
**Geburtsdatum:** 24.11.1979  
**Geburtsort:** Heilbronn  
**Familienstand:** ledig  
**Nationalität:** deutsch

## Bildungsweg

September 1986 – Juli 1990	Besuch der Grundschule Bieringen
September 1990 – Juli 1996	Besuch der Realschule Krautheim
Juli 1996	Mittlere Reife
September 1996 – Juni 1999	Besuch des Staatlichen Aufbaugymnasiums Künzelsau
Juni 1999	Abitur
Oktober 1999 – Januar 2005	Studium der Zahnheilkunde an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Juni 2004 - Januar 2005	Ablegen der Zahnärztlichen Prüfung
Seit Februar 2005	Approbation als Zahnärztin

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. I. Hilger, Dr. rer. nat. M.-R. Lisy
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 18.04.2006

Verena Deißler, Verfasserin